

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON ADH
Untersuchungen zur Physiologie der ADH-Freisetzung
beim Menschen

Josef Ettinger

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Radioimmunologische Bestimmung von ADH;
Untersuchungen zur Physiologie der ADH-Freisetzung
beim Menschen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Ettinger

aus
Obermaishausen

Jahr

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Uhlich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1979



Inhalt:

	S.
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Physiologische Faktoren, die die ADH-Freisetzung beeinflussen	2
1.1.1. Volumen- und Druckrezeptoren	2
1.1.2. Temperatur und Körperhaltung	4
1.1.3. Hormone	5
1.1.3.1. Acetylcholin und Noradrenalin	5
1.1.3.2. Renin-Angiotensin-System	5
1.1.3.3. Prostaglandine	6
1.1.4. Streß	7
1.2. Weitere Parameter zur Beeinflussung der ADH-Sekretion	7
1.2.1. Maschinelle Beatmung	7
1.2.2. Zentral wirkende Pharmaka	8
1.2.2.1. Äthanol	8
1.2.2.2. Narkotika	8
1.2.2.3. Psychopharmaka	8
1.2.3. Andere Medikamente	9
1.3. Ergebnisse neuerer Untersuchungen	10
1.4. Fragestellung	14
2. Versuchsdurchführung und Analytik	16
2.1. Versuchspersonen	16
2.2. Infusion hypertoner Kochsalzlösung	16
2.3. Infusion hypertoner Mannitlösung	17
2.4. Infusion isotoner Kochsalzlösung	17
2.5. Analytik	18
2.5.1. Blutproben	18
2.5.2. Urinproben	18
2.5.3. Bestimmung der einzelnen Parameter	18
2.5.3.1. Osmolalität	18
2.5.3.2. Natrium und Kalium	19
2.5.3.3. Plasma-Renin-Aktivität (PRA)	19
2.5.3.4. Prolactin (hPRL)	19

	S.
2.5.3.5. Antidiuretisches Hormon (ADH)	19
2.5.3.5.1. Extraktion	19
2.5.3.5.2. Antikörper	21
2.5.3.5.3. Radioaktiv markiertes ADH	21
2.5.3.5.4. Assay	22
2.5.3.5.5. Qualitätskontrolle	24
2.5.3.5.6. Versuche zur zeitlichen Verkürzung des Analysenganges	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Infusion 3.76 %iger Kochsalzlösung	26
3.2. Infusion 10 %iger Mannitlösung	30
3.3. Infusion isotoner Kochsalzlösung	34
3.4. Methodische Veränderungen des ADH-RIA- Systems	38
3.4.1. Kinetik der Bindung des 2. Antikörpers ...	38
3.4.2. Ersatz des 2. Antikörpers durch Eiweiß- fällungsmethoden	39
4. Diskussion	42
4.1. Zur Methode	42
4.2. Diskussion der Versuche	44
4.3. Beziehung zwischen Natriumspiegel und Plasma-Renin-Aktivität	51
4.4. Beziehung zwischen Osmolalität und Prolactin-Sekretion	53
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturübersicht	57
7. Lebenslauf	62

1. Einleitung und Fragestellung

Die Regulationsmechanismen zur Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (= ADH = Vasopressin) und die damit verbundenen Kontrollsysteme zur Konstanterhaltung der Flüssigkeitsbilanz sind wesentlich komplizierter, als es nach den bahnbrechenden Arbeiten von Verney und Mitarbeitern (52) zunächst schien (43,44). Verney konnte 1947 durch Infusionen hypertoner Kochsalzlösungen in die Carotis des Hundes die Abhängigkeit der ADH-Sekretion von osmotischen Stimuli nachweisen und postulierte die Existenz hochsensibler "Osmorezeptoren". Sie wurden im Hypothalamus vermutet, sollten auf eine Erhöhung der Osmolalität um nur 1-2% ansprechen und zu einer ADH-Ausschüttung führen. Seither wurde der Osmorezeptor-Mechanismus als der für die Regulation der ADH-Freisetzung primäre betrachtet.

In einer Vielzahl nachfolgender Arbeiten konnten die Befunde Verney's bestätigt werden, wobei in jüngster Zeit die erhöhten Plasma-ADH-Spiegel nach Infusion hypertoner Kochsalzlösung auch radioimmunologisch nachweisbar waren (40).

1.1. Physiologische Faktoren, die die ADH-Sekretion beeinflussen.

1.1.1. Volumenrezeptoren und Druckrezeptoren.

Bereits vor Verney hatte Peters (37) das Konzept aufgestellt, daß die Füllung der "Gefäßräume" die Wasserausscheidung beeinflusse, da eine Expansion des Blutvolumens eine Diurese verursachte und eine Verminderung des Volumens von einer Antidiurese gefolgt war. Arbeiten verschiedener Untersucher, wie die von Baldes und Smirk (4), Rydin und Verney (42) stützten die Annahme der Existenz von Volumenrezeptoren. Henry und Gauer (20) wiesen dann indirekt nach, daß im linken Vorhof des Herzens Volumenrezeptoren lokalisiert sein mußten: Dehnung des linken Vorhofes mittels eines Ballons führte im Tierexperiment an Hunden zu einer Diurese.

Der Mechanismus dieser Volumenrezeptoren wurde folgendermaßen erklärt: Durch den Anstieg des Vorhofdruckes kommt es zur Erregung der Rezeptoren und zu einer Zunahme der Aktionspotentiale pro Zeit. Die Impulse werden über den Vagus in das Zwischenhirn vermittelt; hier bewirken sie einen Abfall der ADH-Sekretion. Umgekehrt führt eine Verminderung des Vorhofdruckes zu einer Abnahme der Impulsfrequenz und einer Zunahme der ADH-Sekretion. Eine zervikale Vagotomie müßte nach diesem Konzept folglich zu einer Zunahme der ADH-Ausschüttung führen. Dies wurde in der Tat von Henry und Pearce (21) und von Perlmutter (36)

gezeigt.

Durch Versuche von Perlmutter (35) und von Share (46) wurde nahegelegt, daß neben diesen Volumenrezeptoren auch Druckrezeptoren im Carotissinus eine Rolle bei der Regulation der ADH-Freisetzung spielen. Dies wurde durch Untersuchungen von Berl (5) endgültig bestätigt, in denen bei Hunden beide Carotiden unterhalb des Carotissinus soweit unterbunden wurden, daß oberhalb der Ligatur eine Druckminderung um 25 mm Hg erreicht wurde. Dabei zeigte sich eine Antidiurese. Bei Unterbindung oberhalb des Carotissinus zeigte sich keine Änderung der Diurese.

Ob Volumen- oder Druckrezeptoren die entscheidende Rolle für die Freisetzung von ADH spielen, blieb weiterhin unklar. Share und Mitarbeiter berichteten 1967 (46), daß bei Hunden eine Blutvolumenverminderung um 10-20% einen signifikanten Anstieg des Plasma-ADH-Spiegels erzeugte. Dabei blieb der arterielle Mitteldruck unverändert. Dagegen zeigten Biro und Forsling (6), daß bei vagotomierten Hunden nach Blutung ein Anstieg des Plasma-ADH-Spiegels erfolgte. Diese beiden Arbeiten zeigen, daß sowohl Druck- als auch Volumenrezeptoren den ADH-Anstieg bei einer Blutung vermitteln können. (Siehe dazu auch (11), (12), (45).) Neben den erwähnten Volumen- und Druckrezeptoren im linken Vorhof und im Carotissinus gibt es wahrscheinlich noch an anderer Stelle lokalisierte Rezeptoren. So wurden z.B. in neueren Arbeiten von Bond und Trank (7) solche Rezeptoren im Hochdrucksystem, nämlich am Aortenbogen und an der rechten Arteria subclavia, nachgewiesen.

1.1.2. Temperatur und Körperhaltung.

Eine Verstärkte Diurese bei Kälteexposition ist seit langem bekannt. Andererseits läßt sich auch bei Aufenthalt in sehr warmer Umgebung eine Antidiurese beobachten. Letzteres dürfte zumindest zum Teil auf den Verlust von hypotonem Schweiß und der darauf folgenden Erhöhung der Plasmaosmolalität zurückzuführen sein. Moore (30) konnte allerdings in Versuchen am Menschen zeigen, daß es bei Hitzeexposition und darauffolgender ADH-Erhöhung zu keiner Änderung der Plasmaosmolalität bzw. der Elektrolytkonzentration im Serum kommt.

Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den durch Temperatureinflüsse hervorgerufenen Änderungen des ADH-Spiegels um Regelmechanismen handelt, die über die intrathorakalen Volumenrezeptoren vermittelt sind: Durch Kälte kommt es zu einer peripheren Vasokonstriktion und damit zu einem vermehrten Blutangebot an die intrathorakalen Gefäße. Umgekehrt erzeugt Wärme eine periphere Vasodilatation mit einem verminderten venösen Rückstrom in den Thorax.

Auch die von Moore (30) beschriebenen Einflüsse der Körperhaltung auf die ADH-Sekretion dürften auf die intrathorakalen Volumenrezeptoren zurückzuführen sein. Im Liegen ist das Blutangebot an das Herz am größten und der ADH-Spiegel am niedrigsten. Im Stehen dagegen verbleibt ein größerer Teil des Blutes in den abhängigen Körperpartien und der venöse Rückstrom ist am geringsten;

die Folge ist ein ADH-Anstieg.

1.1.3. Hormone.

1.1.3.1. Acetylcholin und Noradrenalin.

Bei der Übertragung der afferenten Nervensignale auf den efferenten Schenkel des ADH-Systems spielen Neurotransmitter eine wichtige Rolle. Zu diesem Mechanismus liegen Experimente von Olsson (33), Vandeputte van Messom (51) und Kühn (26) vor. Bei Injektionen von Acetylcholin und Noradrenalin in den 3. Ventrikel der Ziege kam es zu einer deutlichen Antidiurese. Dieser Effekt konnte durch geringe Dosen Atropin blockiert werden. Die Versuche von Kühn, die an Ratten vorgenommen wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse wie die von Olsson durchgeführten Experimente und legen folgende Hypothese nahe:

Es existieren sowohl cholinerge Synapsen vom Muscarin-Typ als auch alpha-adrenerge Synapsen an den neurosekretorischen Zellen. Beide sind möglicherweise bei der Verarbeitung von peripheren Impulsen wichtig.

Bei den beschriebenen Experimenten zeigte sich auch, daß die Instillation von Nikotin in den 3. Ventrikel keinerlei Wirkung auf die ADH-Sekretion hat. Da aber die ADH-freisetzende Wirkung von Nikotin bekannt ist, muß man annehmen, daß durch Nikotin Neuronen adrenerger oder cholinergischer Nervenfasern, die zu den neurosekretorischen Zellen führen, erregt werden.

1.1.3.2. Renin - Angiotensin - System.

Ein Zusammenhang zwischen dem wasserretinierenden ADH-

System und dem salz- und wasserretinierenden Renin-Angiotensin-System wurde erstmals durch Versuche von Bonjour und Malvin (8), Malvin (29) und Mouw (31) wahrscheinlich gemacht: Intravenöse Infusionen von Angiotensin sowie Infusionen in die Carotis und in den 3. Ventrikel von Hunden führten zu einem deutlichen Anstieg der Plasma-ADH-Werte. Untersuchungen von Uhlich (50) am Menschen zeigten prinzipiell vergleichbare Ergebnisse. Eine direkte Wirkung des Angiotensin an der Neurohypophyse mit Freisetzung von ADH ergab sich in den von Gagnon (15) durchgeführten Versuchen an isolierten Neurohypophysen. (Siehe dazu auch (45) und (47).)

1.1.3.3. Prostaglandine.

Prostaglandine bilden für viele Hormone ein wichtiges Bindeglied im jeweiligen Regelkreis. Es stellte sich die Frage, ob sich eine ähnliche Bedeutung auch für das ADH nachweisen ließe. Die Arbeiten von Gagnon (15) und von Vilhardt (53) dazu ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Bei diesen Versuchen wurden isolierte Hypophysen mit Prostaglandinen umspült und die Vasopressinabgabe im Bioassay bestimmt. Bei In-Vivo-Experimenten von Uhlich (48) konnte durch Infusion von Prostaglandinen in die Carotis von Kaninchen ein deutlicher Anstieg der Plasma-ADH-Spiegel erzielt werden. Diese Ergebnisse reichen allerdings nicht aus, den zweifelsfreien Nachweis einer physiologischen Rolle der Prostaglandine bei der Regulation der ADH-Freisetzung zu führen: Die von der Niere gebildeten Prostaglandine werden bei einer einzigen Lungenpassage

zu etwa 80% inaktiviert, und die lokal gebildeten Prostaglandinkonzentrationen erreichen wahrscheinlich keine so hohen Werte, wie sie in den Infusionsversuchen verwandt wurden.

1.1.4. Streß

Ein seit langem bekannter, aber erst in neuerer Zeit genauer untersuchter Einfluß auf die ADH-Sekretion erfolgt durch physischen oder psychischen Streß, wie er bei Operationen oder in Schmerz- und Angstsituationen auftritt. In eigenen Versuchen, in denen Probanden einer Winkelbeschleunigung in einem Drehstuhl ausgesetzt wurden, ergaben sich exzessive Anstiege der Plasma-ADH-Werte (17).

1.2. Weitere Parameter zur Beeinflussung der ADH-Sekretion.

Neben den erwähnten "physiologischen" Freisetzungsmechanismen für ADH gibt es eine ganze Reihe von (meist zufällig entdeckten) externen Einflüssen auf die ADH-Sekretion aus der Neurohypophyse.

1.2.1. Maschinelle Beatmung.

Bei beatmeten Patienten, besonders solchen mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) wird gelegentlich eine Symptomenkonstellation mit Auftreten von Ödemen und Abnahme der Diurese beobachtet. Untersuchungen über eine mögliche Bedeutung von ADH sind noch nicht abgeschlossen;

ein Mechanismus über die Veränderung des Tonus intra-thorakaler Volumendehnungsrezeptoren durch die maschinelle Beatmung ist denkbar.

1.2.2. Zentral wirkende Pharmaka.

1.2.2.1. Äthanol.

Nach Einnahme größerer Mengen von Alkohol tritt eine Diurese ein; diese alkohol-induzierte Hemmung der ADH-Sekretion wird beim Bioassay für ADH zur Supprimierung endogener ADH-Ausschüttung ausgenützt (14).

1.2.2.2. Narkotika.

Patienten in Narkose befinden sich in Antidiurese. Aus den bei Tierexperimenten unter Narkotikaeinfluß gemessenen erhöhten ADH-Spiegeln läßt sich auf einen zentralen, pharmakologischen Effekt der Narkotika auch beim Menschen schließen (2)(19). In diesem Zusammenhang spielt sicher die Streß-induzierte ADH-Freisetzung eine Rolle.

1.2.2.3. Psychopharmaka.

Die zentral sedierende Wirkung der Neuroleptika vom Chlorpromazin-Typ geht mit einer Suppression der ADH-Ausschüttung einher (Literatur bei Ginsburg (16) 1968). Auch andere zentral wirkende Medikamente wie das Antiepileptikum Diphenylhydantoin haben eine hemmende Wirkung auf die ADH-Ausschüttung. Diese Tatsache konnte in Einzelfällen sogar zur symptomatischen Therapie bei einem Patienten mit dem Syndrom inadäquater ADH-Sekretion ausgenützt werden (27).

1.2.3. Andere Medikamente.

Eine Reihe weiterer Medikamente führt zu einer Symptomatik, die am ehesten durch eine erhöhte oder verminderte ADH-Sekretion erklärt werden könnte. Bei den meisten dieser Beobachtungen wurde der Plasma-ADH-Spiegel allerdings nicht gemessen, sodaß eine verbindliche Aussage über die Beeinflussung der ADH-Sekretion unmöglich ist.

Bei therapeutischer Anwendung des Zytostatikums Vincristin wurden von Robertson (39) Messungen des Plasma-ADH-Spiegels vorgenommen. Dabei ergaben sich tatsächlich den vorher beobachteten klinischen Bildern entsprechend inadäquat erhöhte ADH-Spiegel.

Die nachfolgende Tabelle zeigt zusammenfassend nochmals alle bisher beobachteten bzw. diskutierten Beeinflussungsmöglichkeiten der ADH-Sekretion.

A. "Physiologisch"

Osmolalität
Elektrolyte
Blutvolumen
Blutdruck
Temperatur
Körperhaltung
Acetylcholin
Katecholamine
Angiotensin
Prostaglandine
Streß

B. Nicht physiologisch

Überdruckbeatmung
Äthanol
Narkotika
Chlorpromazin
Diphenylhydantoin
Nikotin
Vincristin
Clonidin (24)

Tabelle. Faktoren, die die ADH-Freisetzung beeinflussen.

1.3. Ergebnisse neuerer Untersuchungen.

Nach den Vorstellungen Verney's reagierten die Osmorezeptoren nicht auf eine Erhöhung der Plasmaosmolalität direkt, sondern auf eine Reduktion des Rezeptorvolumens, das seinerseits durch die Änderung der extrazellulären Flüssigkeit hervorgerufen wird. Dieses Konzept basierte auf den Ergebnissen seiner Untersuchungen, wonach die Infusion von hypertoner Kochsalz-, Saccharose- oder Glucoselösung in die Carotis des Hundes eine ADH-Freisetzung bewirkte, während gleich hypertone Harnstofflösungen als Infusion keinen Effekt auf die ADH-Ausschüttung zeigten. Verney interpretierte letzteres als Folge der hohen Permeabilität der Zellmembran für Harnstoff. Durch Ligaturen an verschiedenen Ästen der Arteria carotis interna und die dabei erhobenen Befunde meinte Verney, diese Osmorezeptoren in den vorderen Anteil des Hypothalamus lokalisieren zu können, zumindest jedoch in ein Gebiet, das innerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegt. Erste Zweifel an der Gültigkeit dieser Hypothese tauchten auf, als Kleeman und Cutler (25) zeigen konnten, daß die Infusion von hypertoner Harnstofflösung eine drastische Dehydrierung des Gehirns hervorrief, da Harnstoff die Blut-Hirn-Schranke nur sehr langsam passieren kann. Danach hätte bei dem Versuch Verney's mit Harnstoffinfusion ebenfalls eine ADH-Ausschüttung erfolgen müssen. In den letzten Jahren wurden nun von der Arbeitsgruppe um Andersson und Olsson in Stockholm eine Reihe von Unter-

suchungen durchgeführt (3,13,32,34), deren Ergebnisse am Konzept der alleinigen Bedeutung der Osmorezeptoren weitere Zweifel gerechtfertigt erscheinen lassen. Die Versuche dieser Forscher wurden an wachen Ziegen durchgeführt. Den Tieren wurden verschiedene hypertone Lösungen sowohl in den 3.Ventrikel appliziert als auch in die Arteria carotis infundiert. Die ADH-Ausschüttung wurde dabei allerdings nicht direkt gemessen. Als Maß der ADH-Freisetzung diente das Verhalten der Diurese: Jedes Tier hat seinen eigenen aktuellen ADH-Spiegel im Bioassay selbst registriert. Daß es sich bei Änderungen der Diurese um ADH-Effekte handelte, konnte durch Kontrollversuche gezeigt werden, bei denen die Eminentia mediana der Tiere elektrochirurgisch ausgeschaltet worden war.

Es zeigten sich unter anderem folgende Ergebnisse:

1. Während Infusionen hypertoner Kochsalz-, Saccharose-, Fructose- oder Glucoselösungen in die Carotis der Ziege eine ADH-Freisetzung zur Folge hatten, gab es bei Instillationen der gleichen hypertonen Lösungen in den 3.Ventrikel lediglich bei Kochsalz vergleichbare Effekte; alle anderen Substanzen blieben ohne Wirkung.

2. Die langsame Infusion stark hypertoner Galaktose- oder Glycerollösung in die Arteria carotis hatte keinen Einfluß auf die Diurese, während eine schnelle Infusion nur geringgradig hypertoner Lösungen der gleichen Substanzen eine Zunahme der Diurese zur Folge hatte, was einem Abfall des ADH-Spiegels entspräche.

Aus diesen Ergebnissen zog Andersson folgende Schlüsse:

1. Die von Verney postulierten Osmorezeptoren liegen außerhalb der Blut-Hirn-Schranke und sind durch Änderungen der cerebrospinalen Flüssigkeit, d.h. vom 3.Ventrikel aus, nicht erregbar.
2. Neben den Osmorezeptoren gibt es in der Wand des 3.Ventrikels Natrium-sensitive Rezeptoren, die ebenfalls bei der Regulation der ADH-Freisetzung eine Rolle spielen könnten. Die Relevanz dieser Rezeptoren für die physiologische Regulation der ADH-Ausschüttung findet eine Bestätigung darin, daß Änderungen in der Plasmazusammensetzung sehr rasch auch zu Änderungen in der Zusammensetzung der vom Plexus choroideus gebildeten Cerebrospinalflüssigkeit führen. Damit scheint der Tatsache eine größere Bedeutung zuzukommen, daß neben der Blut-Hirn-Schranke auch die Blut-Liquor-Schranke von Bedeutung ist. Diese weist völlig andere Eigenschaften auf als jene; beispielsweise ist sie für viele Substanzen, die die Blut-Hirn-Schranke nur sehr langsam passieren, gut permeabel. Dies würde erklären, warum es bei schneller Infusion von schwach hypertonen und elektrolytfreien Lösungen zu einer Diurese kommt: Durch die rasche Permeation wurde die cerebrospinale Natriumkonzentration erniedrigt, was wiederum über die Rezeptoren eine ADH-Supprimierung zur Folge hatte. Neueste Untersuchungen von Leksell (28), bei denen durch Blockierung der Natrium-Kalium-ATPase mittels D_2O -Infusion in den 3.Ventrikel der Ziege eine Zunahme der Diurese bzw. ein Abfall der ADH-Sekretion gezeigt werden konnte,

stützen die Annahme von Natrium-sensitiven Rezeptoren in diesem Gebiet.

Bei ähnlichen Versuchen wurde von Andersson ein anderer Effekt beobachtet, der einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus der Angiotensin-stimulierten ADH-Freisetzung liefert: Die gleichzeitige Infusion von Angiotensin und Natrium in den 3. Ventrikel ergab einen weitaus stärkeren Effekt auf die ADH-Freisetzung als die Infusion einer der beiden Substanzen allein (siehe dazu auch (47)). Daraus wurde gefolgert, daß der Wirkungsmechanismus von Angiotensin auf die ADH-Ausschüttung über die Natriumrezeptoren vermittelt wird. Dies könnte auf drei Wegen geschehen:

1. Angiotensin "erleichtert" den Natriumtransport von der Cerebrospinalflüssigkeit zu den Rezeptoren;
2. es erhöht die Empfindlichkeit der Natrium-sensitiven Rezeptoren;
3. es erleichtert den Natriumtransport in die Rezeptorzellen.

Letzteres würde bedeuten, daß der intrazelluläre Natriumgehalt für die Funktion des Rezeptors entscheidend ist. Dazu lassen sich allerdings zur Zeit noch keine endgültigen Aussagen treffen.

1.4. Fragestellung.

Ausgehend von den beschriebenen Untersuchungen von Andersson und Olsson und Mitarbeitern wurde der Versuch unternommen, auch beim Menschen Hinweise für eine Differenzierung des bisher angenommenen Osmorezeptorsystems in ein Osmotisch- und ein Natrium-sensitives System zu finden bzw. zu definieren.

Dazu wurden freiwilligen Probanden intravenös Infusionen mit hypertoner Kochsalz- bzw. elektrolytfreier hypertoner Mannitlösung appliziert und radioimmunologisch die ADH-Konzentrationen im Plasma bestimmt. Um Effekte auf die Volumen- bzw. Druckrezeptoren auszuschließen, wurde bei einem Teil des Kollektivs zu einem späteren Zeitpunkt das gleiche Volumen einer isotonen Kochsalzlösung infundiert und ebenfalls die ADH-Spiegel gemessen. Zu den gleichen Zeitpunkten wie ADH wurden Osmolalität, Natrium und Kalium im Plasma bestimmt. Als weiterer Parameter wurde der Verlauf der Plasma-Renin-Aktivität verfolgt. Damit sollten etwaige Einflüsse des Renin-Angiotensin-Systems auf die ADH-Sekretion, aber auch der PRA-Verlauf unter Natrium- bzw. osmotischer Belastung überprüft werden.

Als weiterer Parameter wurde schließlich der Serum-Prolactin-Spiegel gemessen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Prolactin- und ADH-Spiegeln unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Prolactin ist bei nicht säugenden Wirbeltieren das Schlüsselhormon

für die Elektrolyt- und Flüssigkeitsbilanzierung (Literatur bei Horrobin (22,23)). Ob dieses Hormon auch bei Säugern eine Bedeutung für den Salz-Wasser-Haushalt hat, ist bisher nicht bekannt. Relkin (38) berichtete, daß bei Ratten eine osmotische Belastung mit hypertoner Kochsalzlösung zu einem Prolactinanstieg führte. Im gleichen Jahr (1973) beobachteten Buckman und Mitarbeiter (9) denselben Effekt bei ähnlichen Versuchen am Menschen. Umgekehrt führte eine Wasserbeladung bzw. eine Infusion hypotoner Kochsalzlösung zu einem Abfall des Prolactinspiegels.

Sehr sorgfältig durchgeführte Versuche von Adler und Mitarbeitern (1) ergaben dagegen, daß die Wasserbeladung bzw. die Infusion hypotoner Kochsalzlösung eher zu einem leichten Anstieg des Prolactinspiegels führten, während die Infusion von hypertoner Kochsalzlösung keine Auswirkung auf dieses Hormon hatte.

Durch die nachfolgend beschriebenen Versuche mit radioimmunologischer Bestimmung des Prolactinspiegels sollten weitere Aufschlüsse zu dieser Frage gewonnen werden.

2. Versuchsdurchführung und Analytik.

2.1. Versuchspersonen.

Die Versuche wurden an 10 männlichen freiwilligen Probanden im Alter zwischen 22 und 26 Jahren durchgeführt. Die Versuchspersonen waren gesund und über die Versuche aufgeklärt worden.

5 dieser Personen nahmen an allen 3 Versuchen teil, 9 von ihnen an 2 Versuchen. Lediglich einer der Probanden war nur an einem Versuch beteiligt. Die Untersuchungen erstreckten sich über 5 Monate.

Am Morgen des Versuchstages waren die Probanden nüchtern und hatten seit mindestens acht Stunden keine Nahrung oder Flüssigkeit, besonders aber keinen Alkohol, Kaffee oder Tee zu sich genommen. Auch Nikotin war während dieser Zeit verboten.

2.2. Infusion hypertoner Kochsalzlösung.

Nach Entleerung der Blase wurde den Probanden im Liegen eine Infusionsnadel mit einem Dreivegehahn gelegt, sodaß wiederholte Blutentnahmen möglich waren und laufend entsprechende Lösungen infundiert werden konnten. Nachdem die erste Blutprobe entnommen war, wurde 30 min. lang eine isotone Lävuloselösung mit einer Geschwindigkeit von 50 ml/h infundiert. Diese 30 min. waren dem eigent-

lichen Versuch vorgeschaltet und dienten dazu, eine ausreichend lange Kontrollperiode mit "wahren" Basalwerten von ADH zu erhalten, da das ADH-System auf Streß, wie z.B. den Stich beim Anlegen der Infusion, empfindlich reagiert. Am Ende der Kontrollperiode wurde die zweite Blutprobe entnommen und unmittelbar darauf mit der Infusion von 3.76 %iger Kochsalzlösung begonnen. 500 ml dieser Lösung wurden in 2 Stunden infundiert und von Beginn an alle 20 min. eine Blutprobe entnommen. Nach 120 min. wurde zum letzten Mal Blut entnommen; die Probanden mußten anschließend ihre Blase entleeren.

2.3. Infusion hypertoner Mannitlösung.

Wie beim Versuch mit hypertoner Kochsalzlösung wurde auch hier eine Kontrollperiode von 30 min. vorgeschaltet. Anschließend wurden 500 ml einer 10 %igen Mannitlösung in 2 Stunden infundiert. Die Blutentnahmen wurden nach demselben zeitlichen Schema vorgenommen wie bei der ersten Studie. Auch hier wurde der während des Versuchs produzierte Urin im Anschluß an die Infusion gesammelt.

2.4. Infusion isotoner Kochsalzlösung.

Als Kontrollversuch wurden bei 5 der Versuchspersonen nach demselben Schema wie oben 500 ml einer isotonen Kochsalzlösung infundiert. Der Versuchsablauf entsprach dem der Versuche 1 und 2.

2.5. Analytik.

2.5.1. Blutproben.

Kurz vor Entnahme jeder Blutprobe wurde die Infusion abgestellt und der Infusionsweg mit dem Dreiwegehahn verschlossen. Die ersten 2-3 ml Blut wurden verworfen, um eine Vermischung mit der Infusionslösung zu vermeiden. Dann wurden 20 ml Blut in eine Spritze aufgezogen und die Infusion wieder angestellt.

Das Blut wurde in vorgekühlten, EDTA-beschichteten Röhrchen (zur PRA-Bestimmung), heparinisierten Plastikröhrchen (zur ADH-Analyse) und normalen Blutentnahmegefäßen gesammelt, in Kälte zentrifugiert, und das Plasma bei -20°C eingefroren.

2.5.2. Urinproben.

Nach Bestimmung der Urinmenge vor und nach dem Versuch wurden wenige Milliliter jeder Probe bei -20°C tiefgefroren und zur späteren Bestimmung von Osmolalität, Natrium und Kalium aufbewahrt.

2.5.3. Bestimmung der einzelnen Parameter.

2.5.3.1. Osmolalität.

Die Osmolalität sowohl der Plasma- als auch der Urinproben wurde mit einem Osmometer der Firma Knauer nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung bestimmt. Vor jeder Serie von Bestimmungen wurde das Gerät geeicht.

2.5.3.2. Natrium und Kalium.

Der Natrium- und Kaliumgehalt von Plasma- und Urinproben wurde mit einem Flammenphotometer des Routinelabors der Klinik gemessen.

2.5.3.3. Plasma-Renin-Aktivität (PRA).

Die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität erfolgte mit Hilfe einer radioimmunologischen Methode. Diese basiert auf der Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I durch das Enzym Renin. Der Nachweis des gebildeten Angiotensin I (in ng/ml·h) erfolgte mit einem käuflichen Kit der Firma Becton und Dickinson.

2.5.3.4. Prolactin (hPRL).

Das Hypophysenvorderlappenhormon Prolactin wurde ebenfalls radioimmunologisch nach der Methode von v.Werder (54) bestimmt.

2.5.3.5. Antidiuretisches Hormon (ADH).

Das Antidiuretische Hormon wurde nach der bereits früher (49) beschriebenen Methode radioimmunologisch bestimmt. Da in der vorliegenden Arbeit gerade die besondere Bedeutung der Regulation und Beeinflussung der ADH-Sekretion diskutiert werden soll und einige Modifikationen des analytischen Vorgehens eingeführt wurden, erscheint eine ausführlichere Darstellung des Radioimmunoassays für ADH gerechtfertigt und sinnvoll.

2.5.3.5.1. Extraktion.

Da ADH im menschlichen und tierischen Blut in einer Konzentration von nur einigen Picogramm pro Milliliter vorkommt, war es nicht möglich (wie bei anderen Hormonen),

Plasmaproben direkt in den Radioimmunoassay einzusetzen. Stattdessen mußte dem Assay eine Anreicherungsprozedur vorausgehen, in der das Plasmavolumen eingeeengt und störende, kreuzreagierende Substanzen entfernt wurden. 4 ml Plasma wurden nach Ansäuerung mit 25 %iger Salzsäure mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung vermischt und das dadurch gefällte Eiweiß abzentrifugiert (20 min., 5000 rpm). Der klare Überstand wurde zu 100 mg Florisil, einem Silikat, gegeben und die Röhrchen 20 min. lang geschüttelt. Dabei erfolgte eine Adsorption des ADH an das Florisil.

Nach Zentrifugieren (5 min., 2000 rpm) und Absaugen des Überstandes wurde das Florisil mit dem adsorbierten ADH zweimal gewaschen (mit 1-normaler Salzsäure und mit Aqua bidest.). Anschließend wurde das ADH durch ein Aceton-Salzsäure-Gemisch im Verhältnis 10:1 wieder vom Florisil eluiert. Nach 20 min. Schütteln wurde zentrifugiert (7 min., 3000 rpm) und der klare Überstand abpipettiert. Diese Elution wurde noch ein zweites Mal wiederholt.

Zu dem Eluatvolumen von 2 ml kamen nun 2 ml Diäthyläther; die Proben wurden geschüttelt und die Trennung der beiden Phasen abgewartet. Die obere, Wasser enthaltende (Äther-) Schicht wurde bis zum Meniskus abgesaugt und die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Nach der Lyophilisation und dem Wiederauflösen für die

weitere Analyse war das ursprüngliche Volumen auf 1/6 eingeeengt. Gleichzeitig gingen bei dieser Prozedur im Mittel 30-40 % der ursprünglich vorhandenen ADH-Menge verloren. Die Recovery, die für jede Florisil-Charge neu bestimmt werden mußte, lag also bei 60-70 %.

2.5.3.5.2. Antikörper.

Als Antikörper gegen ADH wurde der in der beschriebenen Arbeit ausführlich charakterisierte Antikörper verwandt. Er wurde vor 4 Jahren durch Immunisierung von Kaninchen mit an Alpha-Globulin gekoppeltem synthetischen ADH gewonnen. Das Antiserum ist seither ohne Wirkungsverlust in Gebrauch und wird in einer Endverdünnung von 1:35000 im Assay eingesetzt.

2.5.3.5.3. Radioaktiv markiertes ADH.

Synthetisches 8-Arginin-Vasopressin wurde nach der Chloramin-T-Methode von Greenwood und Hunter (18) radioaktiv markiert. Dabei wird radioaktives Jod¹²⁵ durch Chloramin T oxydiert und an den Tyrosinring des ADH-Moleküls gebunden. Durch Zugabe von Albumin nach 15 sec. wurde diese Reaktion gestoppt.

Das Markierungsgemisch wurde dann über eine 1.5 x 40 cm Säule mit Sephadex G 25 chromatographisch getrennt. Es ergab sich ein charakteristisches Elutionsprofil mit einem Albumin-, einem nachfolgenden Jod- und schließlich dem ¹²⁵J-ADH-Peak. Die beiden der Probe mit der höchsten Radioaktivität folgenden Fraktionen des ¹²⁵J-ADH-Peak wurden jeweils in kleinen Portionen eingefroren und für den Assay auf eine endgültige Radioaktivität von ca.

3000 cpm/50 μ l verdünnt.

2.5.3.5.4. Assay.

Die Standardkurven wurden wie folgt gewonnen: Zu 50 μ l Eichlösung, die synthetisches ADH in aufsteigenden Konzentrationen von 0-128 pg enthielt, wurden 200 μ l Phosphatpuffer gegeben. Der Pufferlösung war eine geringe Menge Kaninchenserum zugesetzt. Die Plasmaproben wurden in 700 μ l dieses Puffers wiederaufgelöst und 3x200 μ l in den Assay eingesetzt. Das Volumen der Proben wurde durch Zugabe von 50 μ l Puffer auf das Volumen der Standards korrigiert. Dann wurden zu jeder Probe (Standardkurve und unbekannte Plasmaproben) 50 μ l des mit Puffer verdünnten Antiserums zugegeben. Die Proben wurden geschüttelt und für 24 h bei 4 °C vorinkubiert.

Am 2. Tag der Analyse wurden zu allen Proben 50 μ l des Tracers in der oben angegebenen Aktivität gegeben, geschüttelt und für einen Zeitraum von 24 h inkubiert.

Am 3. Tag gab man zu allen Proben 50 μ l eines 1:20 verdünnten Anti-Gammaglobulin-Antiserums zur Präzipitation mit dem ADH-Antikörper. Mit diesem vom Esel stammenden Antiserum wurde eine Trennung von freiem und gebundenem Anteil des Tracers erreicht. Die Proben mußten mit diesem 2. Antikörper nochmals für 24 h inkubiert werden.

Am 4. Tag wurden die Proben schließlich 20 min. bei 3200 rpm zentrifugiert und der klare Überstand abgesaugt. Die verbliebene Radioaktivität im Sediment wurde in einem automatischen Gammazähler gezählt. Die Standardkurve wurde von einem Siemens-Computer des Typs 404/3 nach der

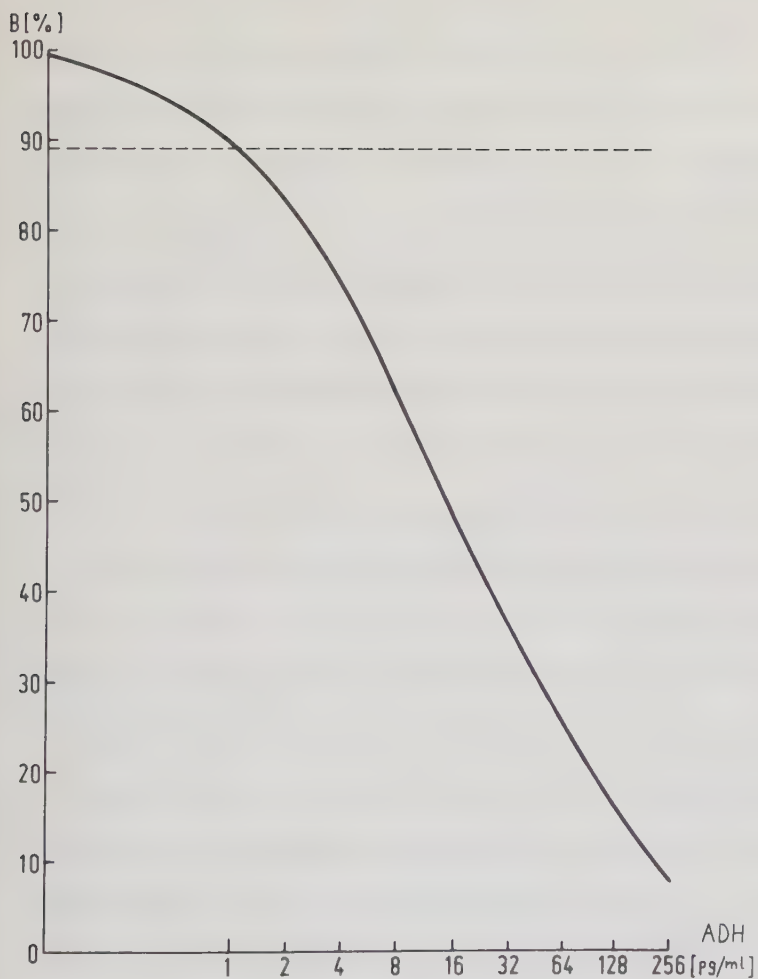


Abb. 1. ADH - Standardkurve

sogenannten Spline-Function berechnet und aufgetragen; die Konzentrationen der unbekannten Plasmaproben wurden nach dieser erstellten Kurve vom Computer errechnet. Die Abbildung 1. zeigt eine vom Computer erstellte Standardkurve.

2.5.3.5.5. Qualitätskontrolle.

Bei jeder Extraktion wurden 2 Standardproben aus einem Plasmapool mitgeführt und anschließend im Assay deren Gehalt an ADH bestimmt. Von allen Standardproben wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die gemessenen ADH-Werte wurden über den jeweiligen Standardwert auf den Mittelwert aller Standards korrigiert, da der Inter-Assay-Variationskoeffizient 25 % betrug.

2.5.3.5.6. Versuche zur zeitlichen Verkürzung des Analysenganges.

Da der Extraktionsvorgang einen Tag beanspruchte und die Inkubationszeiten des Assay im wesentlichen eingehalten werden mußten, betrug der gesamte Analysengang 5 Tage. Aus ökonomischen Gründen und im Hinblick auf die immer wieder notwendige Testung verschiedener Bestandteile der Methode, wie von Eichlösungen, Tracern oder verschiedenen Florisilchargen, erschien es zweckmäßig, den zeitlichen Ablauf des Assays nach Möglichkeit zu verkürzen.

Als erstes wurde versucht, die Inkubationszeit des 2. Antikörpers zu verkürzen. Dazu wurden kinetische Untersuchungen der Bindung des 1. an den 2. Antikörper durchgeführt. Da die aggregierten Gammaglobuline nach der Zentrifugation nur schwer abzugrenzen waren, und sich so möglicher-

weise größere methodische Streuungen ergaben, wurde versucht, die Methode der Trennung des freien vom gebundenen Anteil des Tracers zu modifizieren.

Aufgrund der Tatsache, daß es sich beim ADH um ein relativ kleines Molekül handelt (MG 1080), das noch in Lösung bleibt, wenn Eiweiß bereits ausfällt, wurden zunächst verschiedene Methoden der Eiweißfällung zur Trennung getestet. Im einzelnen wurden eine 2-molare sowie eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung, außerdem Aceton und Polyäthylenglycol (PEG) als 25 %ige Lösung in Aqua bidestillata verwandt. PEG wurde mit und ohne Zugabe von Gammaglobulin getestet.

In einer zweiten Serie wurden dann verschiedene Kaninchen- und Rinder-Gammaglobulinzusätze zu den Proben gegeben und diesmal nur mit PEG gefällt. Schließlich wurde der Einfluß von pH und Temperatur des fällenden Mediums untersucht.

3. Ergebnisse.

3.1. Infusion 3.76 %iger Kochsalzlösung.

Es waren außer Durst, der bei allen Versuchspersonen in verschiedener Stärke auftrat, keine die Probanden beeinträchtigenden Symptome zu beobachten. Die zu Beginn und am Ende der Kontrollperiode entnommenen Blutproben zeigten einen geringgradigen, aber nicht signifikanten Abfall aller gemessenen Parameter. Die Osmolalität fiel von 283.1 ± 2.0 auf 281.4 ± 1.8 mosm/kg, Natrium von 139.1 ± 1.0 auf 136.9 ± 1.1 mval/l, Kalium von 4.16 ± 0.10 auf 4.14 ± 0.10 mval/l, ADH von 2.1 ± 0.5 auf 1.85 ± 0.40 pg/ml, PRA von 2.71 ± 0.60 auf 1.72 ± 0.30 ng/ml·h und Prolactin von 205.7 ± 22.2 auf 178.1 ± 18.9 μ E/ml. Für die Feststellung eines Anstieges oder Abfalles der gemessenen Parameter nach Infusion wurden die vom Ende der Vorperiode stammenden Daten als Ausgangswerte verwandt.

Bis zum Ende der Infusion von 3.76 %iger Kochsalzlösung stiegen Osmolalität und ADH auf Maximalwerte von 295.6 ± 3.7 mosm/kg und 4.13 ± 1.40 pg/ml. Ein signifikanter Anstieg des Plasma-ADH-Spiegels war nach 60 min. zu sehen; die Serumosmolalität war zu diesem Zeitpunkt bereits um 2 % angestiegen. Parallel dazu stiegen Natrium- und Kaliumspiegel im Serum von 136.9 ± 1.1 auf 143.4 ± 1.4 mval/l und von 4.14 ± 0.10 auf 4.84 ± 0.30 mval/l.

Die Plasma-Renin-Aktivität war bereits nach 20 min. signifikant abgefallen und ging bis zum Ende des Versuchs auf Minimalwerte von 0.55 ± 0.10 ng/ml·h zurück.

Die Prolactinwerte im Serum zeigten während der Infusion keine signifikante Änderung.

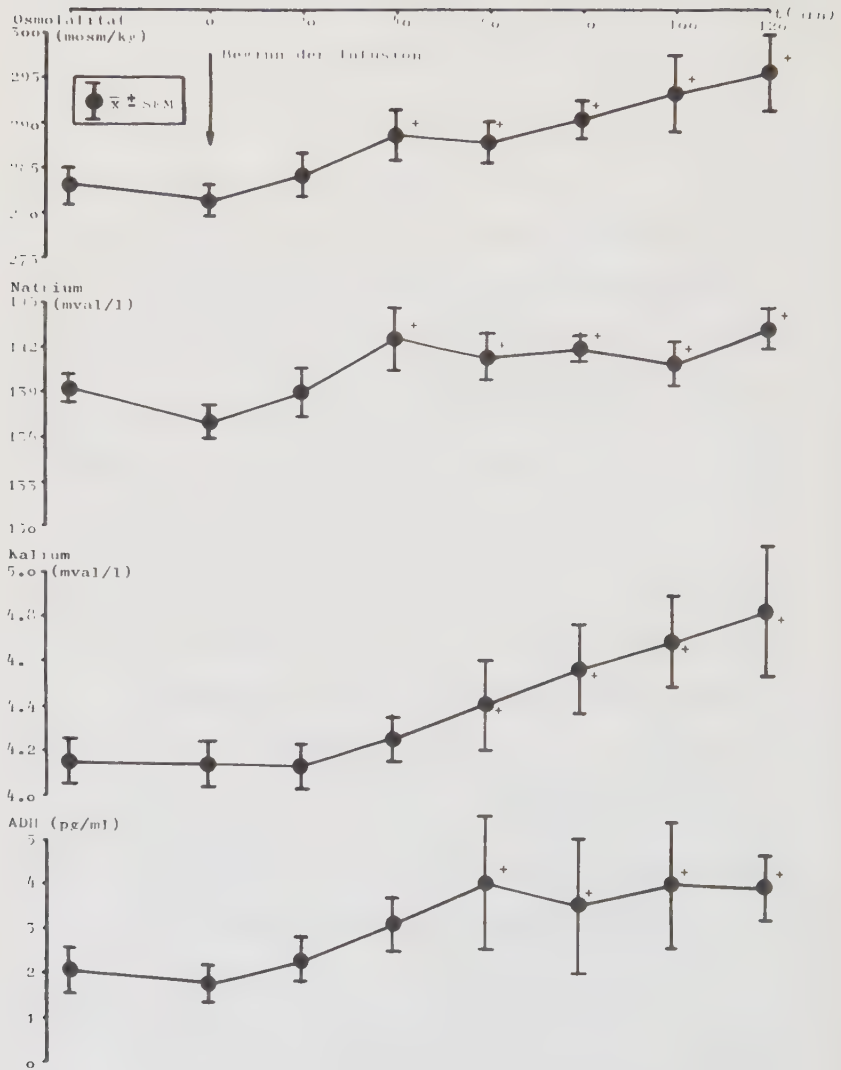
Eine Übersicht über den Verlauf der verschiedenen Parameter gibt Abbildung 2.

Alle Werte für Osmolalität, Natriumkonzentration und ADH-Spiegel wurden einer Regressionsanalyse unterworfen. Dabei ergab sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Plasma-Osmolalität und der ADH-Konzentration ($r = 0.43$; $p = 0.001$), weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen Serum-Natriumspiegel und ADH ($r = 0.29$; $p = 0.01$). Wurde der Einfluß des Natriums auf die Osmolalität ausgeschaltet, ergab sich für den Zusammenhang zwischen Osmolalität und ADH-Spiegel ein sogenannter partieller Korrelationskoeffizient von 0.28, der für $p = 0.05$ signifikant war.

Den Regressionsgleichungen zufolge wäre der Plasma-ADH-Spiegel definierbar durch die Gleichung $ADH = 0.14$ (Osmolalität - 267.1) oder bei Abhängigkeit vom Serum-Natriumspiegel durch die Gleichung $ADH = 0.2$ (Natriumkonzentration - 126.2).

Die Analyse des Zusammenhanges zwischen der Plasma-Renin-Aktivität und dem Serum-Natriumspiegel zeigte eine inverse Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ($r = -0.235$; $p = 0.05$).

Eine negative Korrelation ergab sich auch für die



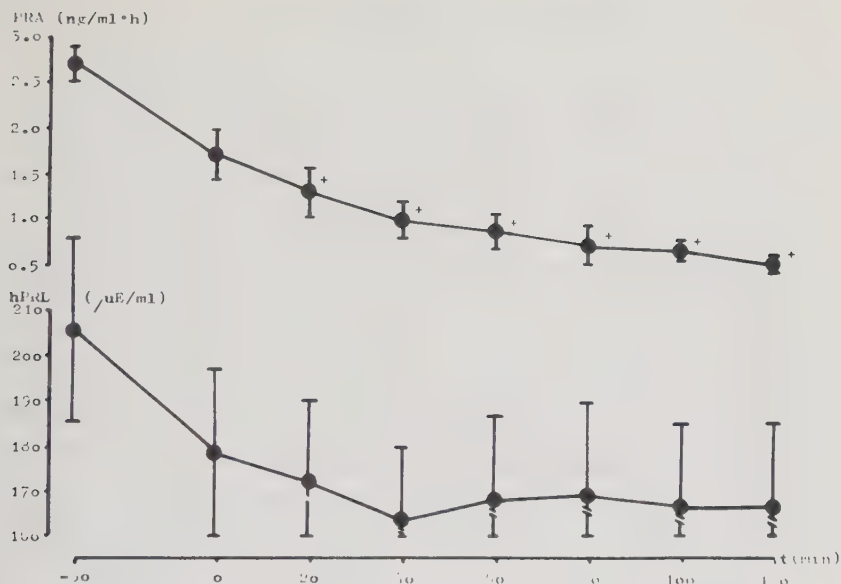


Abb. 2. Verhalten von Osmolalität, Natrium, Kalium, ADH, PRA und hPRL unter Infusion von 3.76 %iger Kochsalzlösung (gegenüber den Basalwerten signifikante Änderungen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet).

Beziehung Osmolalität und Prolactin ($r = -0.29$; $p = 0.05$).

Nach Beendigung dieses Versuches betrug das Urinvolumen im Mittel 270 ml, dabei fielen die Urinosmolalität von 988.5 vor dem Versuch auf 872.5 mosm/kg und die Urin-Kaliumkonzentration von 98.1 auf 84.4 mval/l, während die Urin-Natriumkonzentration von 153.7 auf 234.5 mval/l anstieg.

3.2. Infusion 10 %iger Mannitlösung.

Bei allen Versuchspersonen trat ein mäßiges Durstgefühl auf, das geringer war als bei den Versuchen mit Infusion hypertoner Kochsalzlösung. Von Beginn bis zum Ende der Vorperiode änderten sich die gemessenen Parameter in unterschiedlicher, wiederum nicht signifikanter Weise: Während Osmolalität, Natrium und Kalium von 277.7 ± 4.1 mosm/kg, 136.9 ± 2.0 mval/l und 4.05 ± 0.10 mval/l zu Beginn auf 280.0 ± 2.1 mosm/kg, 138.4 ± 0.7 mval/l und 4.23 ± 0.20 mval/l am Ende der Vorperiode anstiegen, fielen ADH und PRA von 1.96 ± 0.30 pg/ml und 2.13 ± 0.40 ng/ml·h auf 1.76 ± 0.30 pg/ml und 1.75 ± 0.40 ng/ml·h. Die am Ende der Vorperiode erhaltenen Daten wurden wiederum als Basalwerte verwandt.

Während der Infusion von 10 %iger Mannitlösung stiegen Osmolalität und ADH auf mittlere Maximalwerte von 284.4 ± 2.0 mosm/kg und 2.03 ± 0.70 pg/ml. Der maximale Anstieg der Osmolalität betrug 1.5 %. Dabei ergab sich kein signifikanter Anstieg der ADH-Konzentration.

Der Natriumspiegel im Serum fiel von 138.4 ± 0.7 auf 134.0 ± 0.9 mval/l, während die Kaliumkonzentration von 4.23 ± 0.20 auf 4.35 ± 0.20 mval/l anstieg.

Die Plasma-Renin-Aktivität war nach 40 min. signifikant gegenüber dem Ausgangswert vermindert und fiel bis zum Ende des Versuches auf 0.82 ± 0.20 ng/ml·h ab.

Die Prolactinwerte zeigten keine signifikante Änderung.

Die Abbildung 3. zeigt den Verlauf aller gemessenen Para-

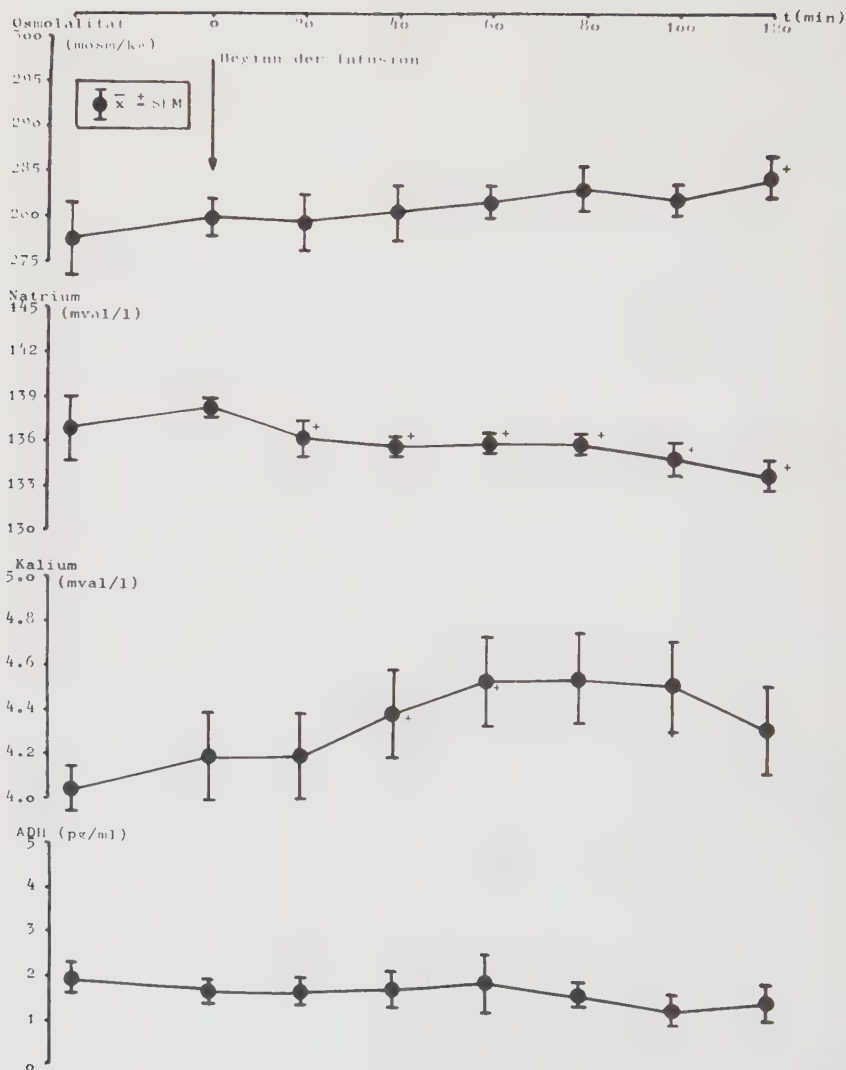
meter während der Infusion von 10 %iger Mannitlösung. Bei allen Werten für Osmolalität, Natriumkonzentration und ADH-Spiegel wurde eine Korrelationsberechnung durchgeführt. Es ergab sich unter den beschriebenen Versuchsbedingungen keine Korrelation zwischen der Plasmaosmolalität und der ADH-Konzentration.

Dagegen war die Korrelation zwischen der Natriumkonzentration und dem ADH-Spiegel mit $r = 0.195$ auf dem 5 %-Niveau knapp signifikant. Daraus wäre der ADH-Spiegel definierbar durch die Gleichung $ADH = 0.07 (\text{Natriumkonzentration} - 108.5)$.

Zwischen Serum-Natriumspiegel und der Plasma-Renin-Aktivität ergab sich eine signifikant positive Korrelation ($r = 0.34$; $p = 0.01$).

Für Osmolalität und Prolactinkonzentration im Serum war keine signifikante Korrelation nachweisbar.

Am Ende des Versuches betrug das Urinvolumen im Mittel 413 ml; dabei fielen die Urinosmolalität von 934.3 vor auf 676.8 mosm/kg nach dem Versuch, die Urin-Natriumkonzentration von 159.5 auf 121.6 mval/l und die Urin-Kaliumkonzentration von 112.4 auf 47.1 mval/l.



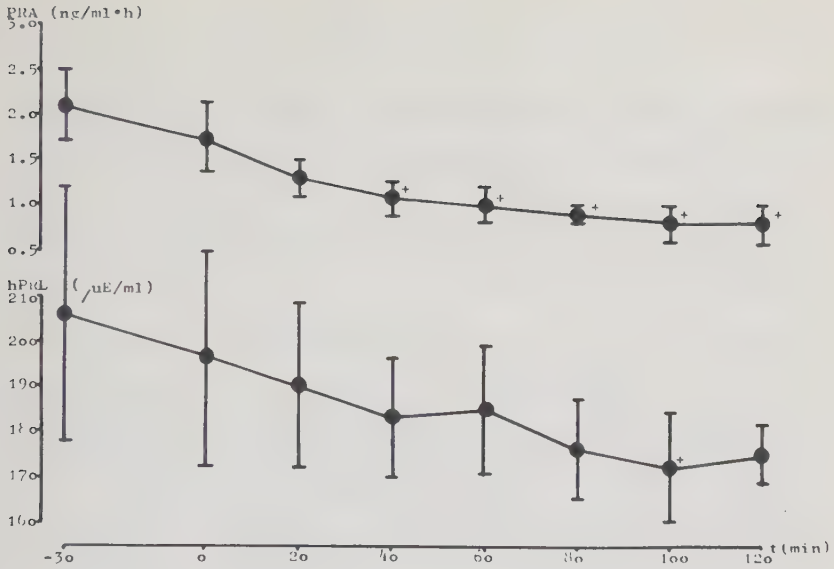


Abb. 3. Verhalten von Osmolalität, Natrium, Kalium, ADH, PRA und hPRL unter Infusion von 10 %iger Mannitlösung (gegenüber den Basalwerten signifikante Änderungen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet).

3.3. Infusion isotoner Kochsalzlösung.

Während dieser Versuche traten bei den Probanden keine beeinträchtigenden Symptome auf. Ein geringgradiges Durstgefühl, das schon zu Beginn des Versuches wegen der Nüchternheit der Versuchspersonen bestand, wurde durch die Infusion nicht gesteigert.

Von Beginn bis zum Ende der Vorperiode zeigten sich geringe, aber wiederum nicht signifikante Änderungen aller gemessenen Parameter. Im einzelnen stiegen die Osmolalität von 280.8 ± 4.4 auf 285.6 ± 3.0 mosm/kg, das Serumnatrium von 140.0 ± 0.9 auf 141.6 ± 1.3 mval/l, das Serumkalium von 4.04 ± 0.10 auf 4.25 ± 0.10 mval/l und der ADH-Spiegel von 1.02 ± 0.40 auf 1.29 ± 0.20 pg/ml. Die Plasma-Renin-Aktivität fiel von 1.23 ± 0.30 auf 0.97 ± 0.20 ng/ml·h und die Prolactinkonzentration von 207.0 ± 26.3 auf 189.0 ± 4.0 μ E/ml.

Die am Ende der Vorperiode erhaltenen Daten wurden wieder als Basalwerte verwandt.

Während der Infusion von 500 ml isotoner Kochsalzlösung veränderten sich die gemessenen Größen uneinheitlich: Die Osmolalität im Plasma, die Kalium- und ADH-Konzentration sowie der Prolactinspiegel zeigten einen oszillierenden Verlauf mit einem nur in einem Fall signifikanten Unterschied zum Ausgangswert: Nach 100 min. war die Osmolalität mit 280.2 ± 3.6 gegenüber 285.6 ± 3.0 mosm/kg zu Beginn der Infusion signifikant vermindert. Die Serum-Natriumkonzentration zeigte eine fallende

Tendenz, die jedoch nur in einem Fall, nämlich bei 100 min., signifikant vom Basalwert unterschiedlich war.

Einen deutlichen Abfall zeigte die Plasma-Renin-Aktivität, die von 0.97 ± 0.20 auf ein Minimum von 0.59 ± 0.20 ng/ml·h am Ende der Infusion zurückging. Die Änderungen des PRA-Spiegels waren nach 80 min. signifikant vom Ausgangswert verschieden.

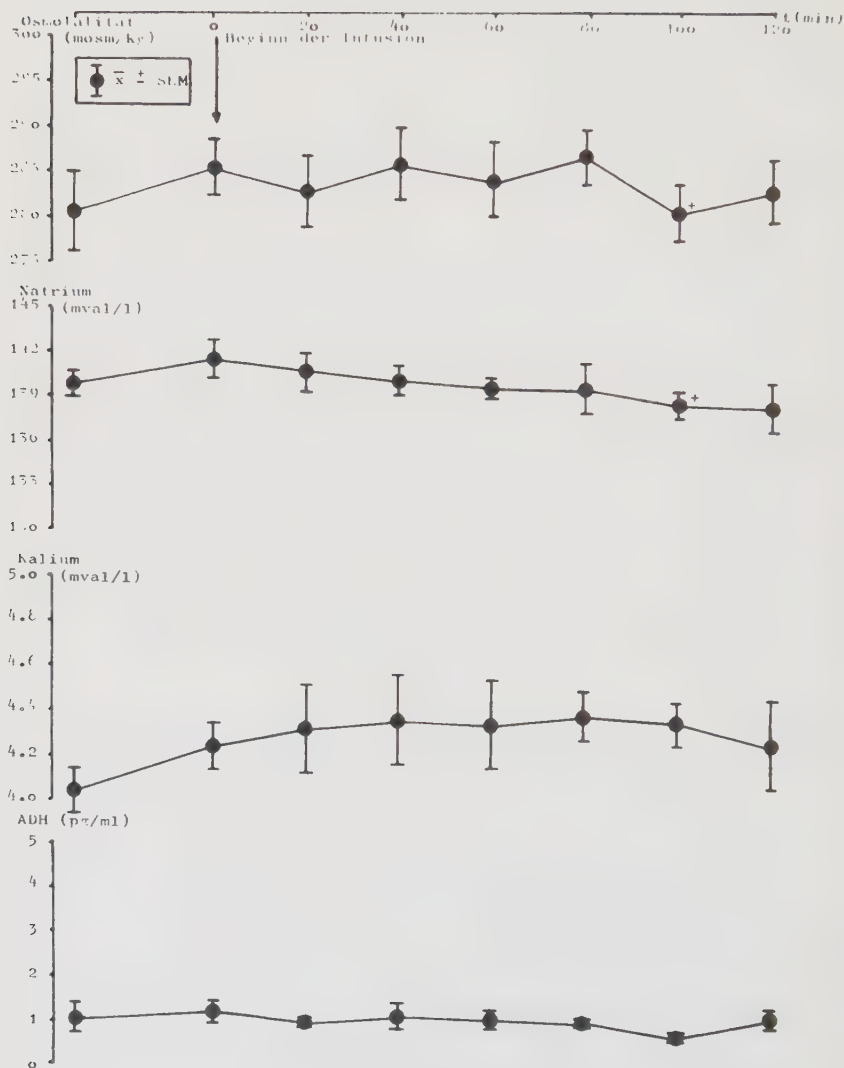
Die Abbildung 4. zeigt den Verlauf der gemessenen Größen während der Infusion isotoner Kochsalzlösung.

Bei der Analyse der Korrelationen der Werte für Osmolalität, Natrium- und ADH-Konzentration ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen Osmolalität und ADH. Der Serum-Natriumspiegel korrelierte in dieser Untersuchungsreihe nicht mit dem ADH-Spiegel. Dagegen zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Kaliumspiegel und der ADH-Konzentration ($r = 0.33$; $p = 0.05$).

Zwischen Natriumkonzentration und PRA ergab sich bei den vorliegenden Experimenten keine signifikante Korrelation.

Osmolalität und Prolactinspiegel waren ebenfalls nicht miteinander korreliert.

Das Urinvolumen betrug am Ende des Versuches im Mittel 230 ml. Dabei veränderten sich die gemessenen Parameter uncharakteristisch: Die Osmolalität fiel von 976 auf 878 mosm/kg, während die Natriumkonzentration im Urin von 168.8 auf 207.0 mval/l und die Kaliumkonzentration von 83.1 auf 116.1 mval/l anstiegen.



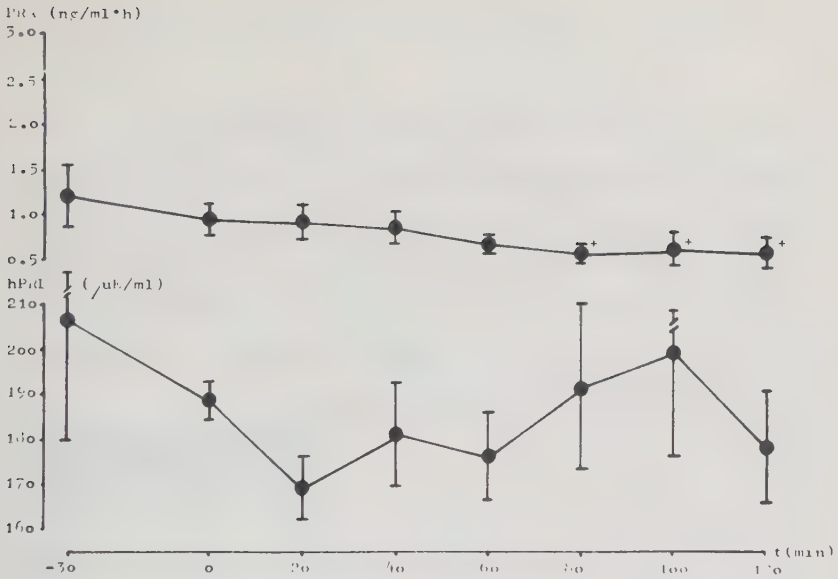


Abb. 4. Verhalten von Osmolalität, Natrium, Kalium, ADH, PRA und hPRL unter Infusion von isotoner Kochsalzlösung (gegenüber den Basalwerten signifikante Änderungen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet).

3.4. Methodische Veränderungen des ADH-RIA-Systems.

3.4.1. Kinetik der Bindung des 2. Antikörpers.

Kinetische Untersuchungen zeigten, daß bereits nach einer Inkubationsdauer von 10-12 h eine ausreichende Bindung zwischen dem 1. und dem 2. Antikörper stattgefunden hatte. Wie aus der Abbildung 5. hervorgeht, betrug der Anstieg der Bindung, ausgedrückt als $\frac{B-N}{T-N}$, in der Zeit von 10 bis 24 h nach Beginn der Inkubation nur 2 %.

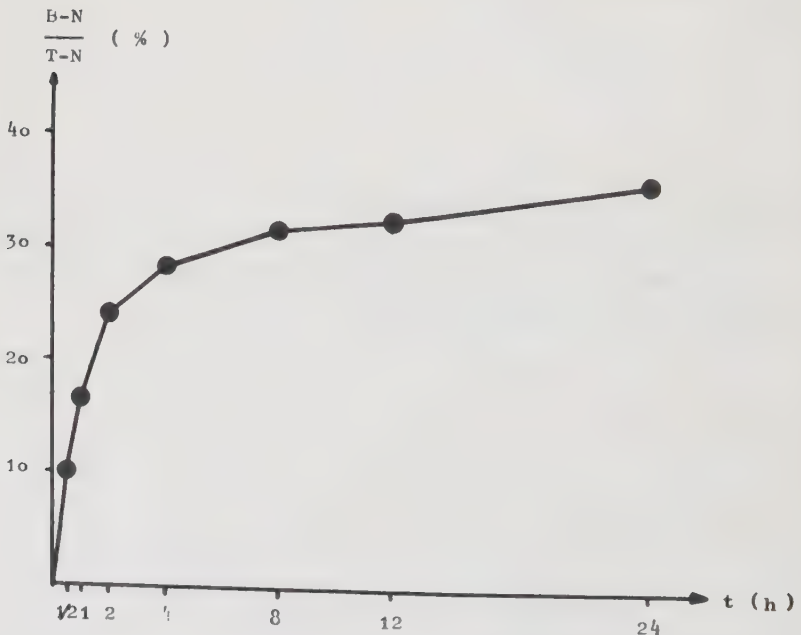


Abb. 5. Bindungskinetik des 2. Antikörpers, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Bindung B an der Gesamtaktivität T (N = unspezifische Bindung).

3.4.2. Ersatz des 2. Antikörpers durch Eiweißfällungsmethoden.

Von allen zur Gammaglobulinausfällung verwendeten Lösungen ergab die Polyäthylenglycollösung nach vorheriger Zugabe von Kaninchengammaglobulin ein Ergebnis, das dem unter Verwendung eines 2. Antikörpers sehr nahe kam. Die prozentuale Bindung der verschiedenen verwendeten Lösungen zeigt die Abbildung 6.

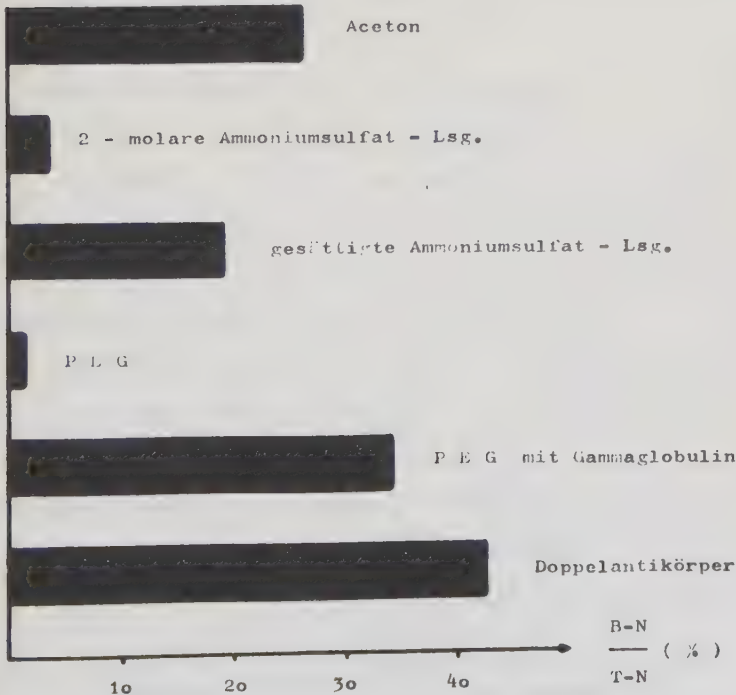


Abb. 6. Prozentuale Ausfällung der gebundenen Radioaktivität bei verschiedenen Verfahren der Eiweißfällung, ausgedrückt in Prozent der Gesamtaktivität T (N = unspezifische Bindung).

Der optimale Zusatz von Gammaglobulin, der nur zur besseren Abgrenzung des gefällten Eiweißes vom Überstand nach der Zentrifugation diente, lag bei 1 mg pro Röhrchen. Dabei war die Herkunft des Gammaglobulins ohne Bedeutung.

Eine unterschiedliche Temperatur der PEG-Lösung - getestet wurde bei 4 °C und bei 22 °C - erbrachte keine Unterschiede in der Qualität der Fällung.

Bei der Ansäuerung der PEG-Lösung von einem Ausgangswert von pH = 5.8 auf pH = 2 kam es zu keiner Fällung mehr.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Trennung wie folgt durchgeführt: 24 h nach Zugabe des radioaktiv markierten ADH wurden in jedes Röhrchen 50 µl einer 2 %igen Rinder-Gammaglobulinlösung in Phosphatpuffer zugesetzt. Anschließend wurden 0.5 ml der 25 %igen PEG-Lösung dazugegeben. Die Röhrchen wurden 3-5 min. kräftig geschüttelt und anschließend 20 min. lang bei 3200 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt und der gebundene Anteil der Radioaktivität im Sediment im automatischen Gammazähler gezählt. Einen Vergleich der beiden Trennungsmethoden - 2. Antikörper und Polyäthylenglycol - zeigt die Abbildung 7., die das Ergebnis zweier parallel durchgeführter Assays als Eichkurven und als Kurven der prozentualen Bindung der Gesamtaktivität darstellt.

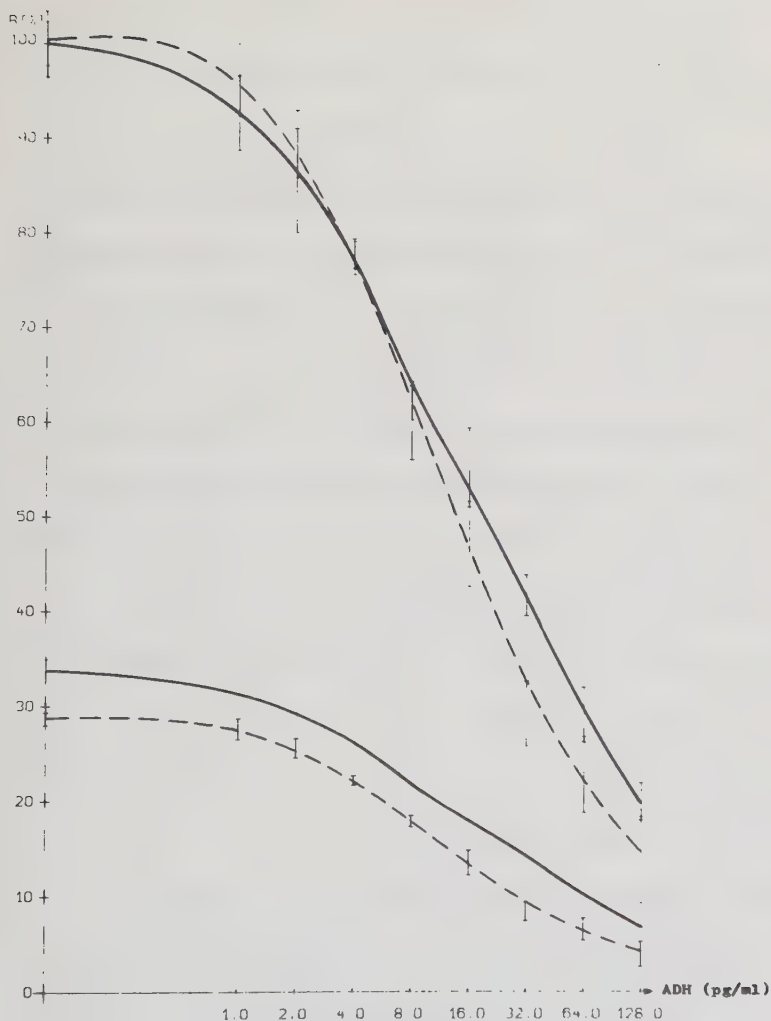


Abb. 7. Vergleich des 2. Antikörpers mit der PEG - Fällung. Die oberen beiden Kurven sind Eichkurven, die unteren geben die prozentuale Bindung der Gesamtaktivität wieder. Die Kurven der PEG - Fällung sind jeweils gestrichelt dargestellt.

4. Diskussion.

4.1. Zur Methode.

Die Ergebnisse der beschriebenen kinetischen Untersuchungen hätten es ermöglicht, die ADH-Analyse von ursprünglich 5 Tagen - einen Tag für die Extraktion mitgerechnet - um einen halben Tag zu verkürzen. Im Hinblick auf die routinemäßig durchgeführte ADH-Bestimmung erschien dies noch nicht ausreichend. Es wurde deswegen auf andere Möglichkeiten der Trennung von freiem und gebundenem Hormon übergegangen. Gegenüber vielen anderen ähnlich analysierten Hormonen erwies sich dabei vor allem die Tatsache als Vorteil, daß ein kleines Peptid wie ADH in verschiedenen Lösungsmitteln löslich bleibt, während größere (Eiweiß-) Moleküle bereits ausgefallen sind (10). Dabei wurde allerdings ein spezifisches Verfahren - die Doppelantikörpermethode - zugunsten einer relativ unspezifischen Methode aufgegeben.

Wie die Ergebnisse der PEG-Fällung, welche von allen getesteten Methoden die besten Resultate erbrachte, zeigen, besteht nur eine geringe Verminderung des gebundenen Anteils an der Gesamtaktivität gegenüber der Doppelantikörpermethode. Die mit beiden Methoden parallel durchgeführten Assays erbringen nahezu identische Eichkurven. Die prozentuale Bindung der Gesamtaktivität ist bei der PEG-Fällung um nur 5 % geringer als bei der

Doppelantikörpermethode. Dieser Unterschied ist unerheblich, da sich bei der Verwendung von frisch markiertem ADH mit dem Doppelantikörper eine Bindungsrate von ca. 55 % für den Nullwert ergab.

Entscheidender Vorteil der methodischen Veränderung jedoch ist, daß sich durch die Trennung von freiem und gebundenem Hormon mit der PEG-Fällung eine zeitliche Verkürzung des gesamten Analysenganges um einen ganzen Tag gegenüber der vorher verwendeten Methode ergab. Zu diesem Vorteil kommt ein weiterer:

Bei der Fällung mit Polyäthylenglycol läßt sich nach der Zentrifugation ein dicker, gut sichtbarer Niederschlag von dem klaren Überstand abgrenzen. Dies erleichtert ein genaues Absaugen wesentlich und dürfte damit zu einer Verminderung der Streuung innerhalb von Mehrfachwerten führen.

4.2. Diskussion der Versuche.

Das von Verney (52) aufgestellte Konzept der alleinigen Osmorezeptor-vermittelten Flüssigkeitsregulierung bedarf nach den in jüngster Zeit durchgeführten Untersuchungen von Andersson und Olsson (3,13,32,34) möglicherweise einer ergänzenden Modifikation. Die Versuchsergebnisse nach Infusionen hypertoner Lösungen in die Arteria carotis und in den 3.Ventrikel von Ziegen legen nahe, daß es in der Wand des 3.Ventrikels Natrium-sensitive Rezeptoren gibt, die neben den Osmorezeptoren wesentlich an der Regulation der ADH-Freisetzung beteiligt sind.

Der Anstieg der Plasma-ADH-Konzentration nach Infusion hypertoner Kochsalzlösung läßt sich auch im Experiment am Menschen nachweisen. Nach einer 60-minütigen Infusion kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Plasma-ADH-Spiegels; zu diesem Zeitpunkt ist die Osmolalität gegenüber dem Basalwert um 2 % erhöht. Ob die Erhöhung des ADH-Spiegels durch den Anstieg der Osmolalität oder die Erhöhung der Natriumkonzentration (sie lag zu diesem Zeitpunkt um 3.3 % über dem Basalwert) verursacht worden ist, läßt sich nicht eindeutig beantworten, da Natriumkonzentration und Osmolalität während des Versuches parallel verlaufen.

Die Korrelationen der Einzelwerte von Osmolalität, Natrium- und ADH-Spiegel zeigen eine signifikant positive Korrelation zwischen Natrium und ADH ($r = 0.29$), sowie zwischen Osmolalität und ADH ($r = 0.28$, partieller

Korrelationskoeffizient nach Ausschalten des Natriumeinflusses auf die Osmolalität). Die Korrelationskoeffizienten lassen also durch ihre vergleichbare Größe keine weiteren Schlüsse zu. Die beobachtete positive Korrelation zwischen Kaliumkonzentration und ADH ist nicht geklärt und dürfte keine Aussage über eine Abhängigkeit der ADH-Sekretion vom Kaliumspiegel erlauben: Nach den Ergebnissen einer Arbeit von Russell (41) an isolierten Hypophysen kommt es erst bei einer Erhöhung des Kaliumspiegels um das 5-10-fache des Basalwertes zu einer ADH-Freisetzung.

Im Gegensatz zu der 4-fach isotonen Kochsalzlösung wurde bei den Versuchen mit Mannit eine nur 2-fach isotone Lösung verwandt. Eine vergleichbar hohe Hypertonizität wie bei Kochsalz zu verwenden war nicht möglich, da die dann induzierte Diurese zu einem ausgeprägten Natrium- und Volumenverlust geführt hätte und der Versuch durch die damit verbundenen Volumeneffekte auf die ADH-Freisetzung beeinträchtigt worden wäre.

Demzufolge läßt sich der maximal nur 1.5 %ige Anstieg der Plasmaosmolalität bei der Infusion von Mannitlösung nicht dadurch erklären, daß die für die ADH-Ausschüttung verantwortlichen Rezeptoren auf Kochsalz stärker als auf Mannit reagieren. Verantwortlich dafür ist die niedrigere Hypertonizität der Mannitlösung. Bemerkenswert ist der bereits nach 20 min. Infusionsdauer signifikante Abfall des Serum-Natriumspiegels.

Es kommt im Mittel zu einem geringgradigen Anstieg der Osmolalität, der allerdings erst am Ende des Versuches, nach 120 min., signifikant wird. Der ADH-Spiegel verläuft nicht parallel dazu: Einem Anstieg in der ersten Stunde steht ein Abfall in der zweiten Stunde gegenüber. Signifikante Änderungen gegenüber dem Basalwert treten dabei nicht auf.

Die Korrelation zwischen Osmolalität und ADH, die annähernd Null ist, spricht dafür, daß die Osmolalität zumindest in dieser Versuchsgruppe keinen Einfluß auf die ADH-Sekretion hat. Dem steht allerdings ein Einzelbefund (Proband H.Z.) gegenüber, der ein deutlich paralleles Verhalten von Osmolalität und ADH-Spiegel zeigt. Die Änderungen des Natriumspiegels sind nur sehr gering und verhalten sich eher gegenläufig zum ADH.

Die Abbildung 8. zeigt den Verlauf dieser drei Größen bei dem erwähnten Einzelfall.

Der Gegensatz zwischen diesem Einzelbefund und dem Ergebnis des Gesamtkollektivs läßt sich nur mit einer individuell recht unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Mannit oder andere osmotische Reize erklären.

In der Versuchsgruppe mit Infusion hypertoner Mannitlösung ist eine positive Korrelation zwischen Natriumspiegel und ADH-Konzentration nachweisbar, obwohl die Korrelation Osmolalität - ADH fast Null ist. Dies legt den Schluß nahe, daß es neben der osmotischen Regulation der ADH-Freisetzung einen zweiten Mechanismus, nämlich eine Steuerung durch Natrium-sensitive Rezeptoren, gibt.

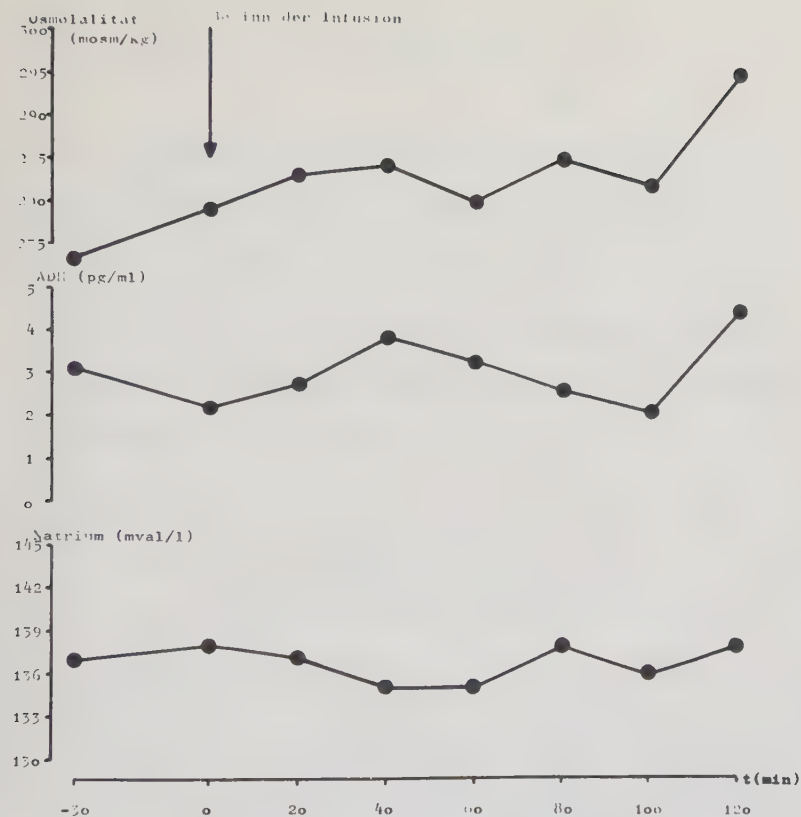


Abb. 8. Verlauf von Natriumspiegel, Plasma-Osmolalität und ADH - Konzentration bei dem Probanden H.Z. unter Infusion hypertoner Mannitolösung.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Versuche könnte man schließen, daß die Natriumrezeptoren sensitiver sind als die Osmorezeptoren. Möglicherweise kehrt sich die durch den Natriumabfall bedingte ADH-Suppression erst dann um, wenn eine Erhöhung der Osmolalität über einen "Grenzwert" von ca. 2 % des Ausgangswertes erfolgt. Bei der relativ großen Streuung der Korrelation zwischen

Natrium und ADH spielt sicher die bereits erwähnte individuell unterschiedliche Ansprechbarkeit der einzelnen Probanden eine Rolle.

Unterwirft man alle gemessenen Daten einschließlich der Kontrollgruppe (mit Infusion isotoner Kochsalzlösung) einer Regressionsanalyse und wertet sie jeweils als Einzelmeßwerte, so ergibt sich ein der Gruppe 1 (Infusion hypertonen Kochsalzlösung) vergleichbares Bild: Das Serumnatrium korreliert mit dem ADH-Spiegel ($r = 0.30$) ebenso wie die Osmolalität ($r = 0.37$). Beide Korrelationen sind signifikant ($p = 0.001$).

Dies spricht ebenfalls dafür, daß beide Parameter in die Regulation der ADH-Freisetzung eingeschaltet sind.

Die Abbildungen 9. und 10. zeigen die Korrelationen zwischen Osmolalität und ADH, sowie zwischen Natrium und ADH mit den zugehörigen Regressionsgeraden. Der höhere Korrelationskoeffizient bei der Osmolalität beruht wahrscheinlich auf dem Einfluß der Natriumkonzentration auf die Osmolalität in der ersten Versuchsgruppe; dieser Einfluß war hierbei naturgemäß nicht auszuschalten.

Andere, die ADH-Ausschüttung beeinflussende Parameter können mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Wie der ADH-Verlauf in der Kontrollgruppe mit Infusion isotoner Kochsalzlösung zeigt, bewirken 500 ml einer isotonen Flüssigkeit keine meßbare Änderung der ADH-Spiegel. Der eingangs beschriebene Angiotensin-Einfluß ist durch den bei beiden Versuchsgruppen erfolgten Abfall der Plasma-Renin-Aktivität auszuschließen.

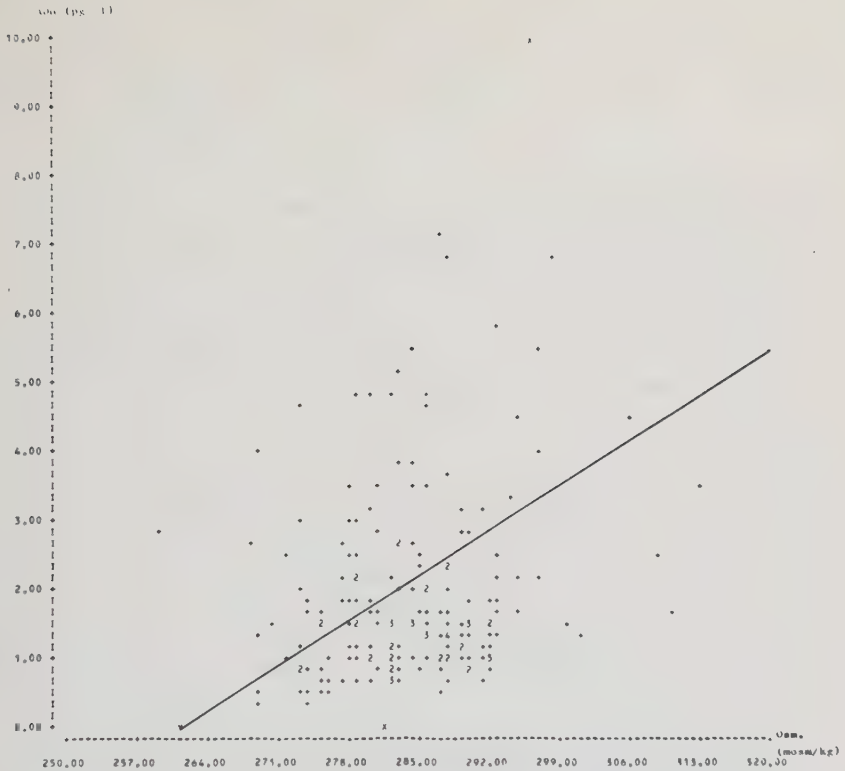


Abb. 9. Darstellung der Korrelation zwischen Osmolalität und ADH unter Berücksichtigung aller drei Versuchsgruppen. Die Gerade gibt die Regressionsgerade von Osmolalität nach ADH wieder.

Angesichts der zahlreichen möglichen Einflüsse auf die ADH-Sekretion muß man mathematische Modelle, wie beispielsweise eine lineare Abhängigkeit des ADH-Spiegels von der Osmolalität, als der Komplexität des Regelkreises ungenügend betrachten. Solche Gleichungen erfassen in aller Regel nur einen Aspekt der Abhängigkeit der ADH-Sekretion von einer Vielzahl verschiedenster Variabler. Außerdem zeigen biologische System an den Grenz-

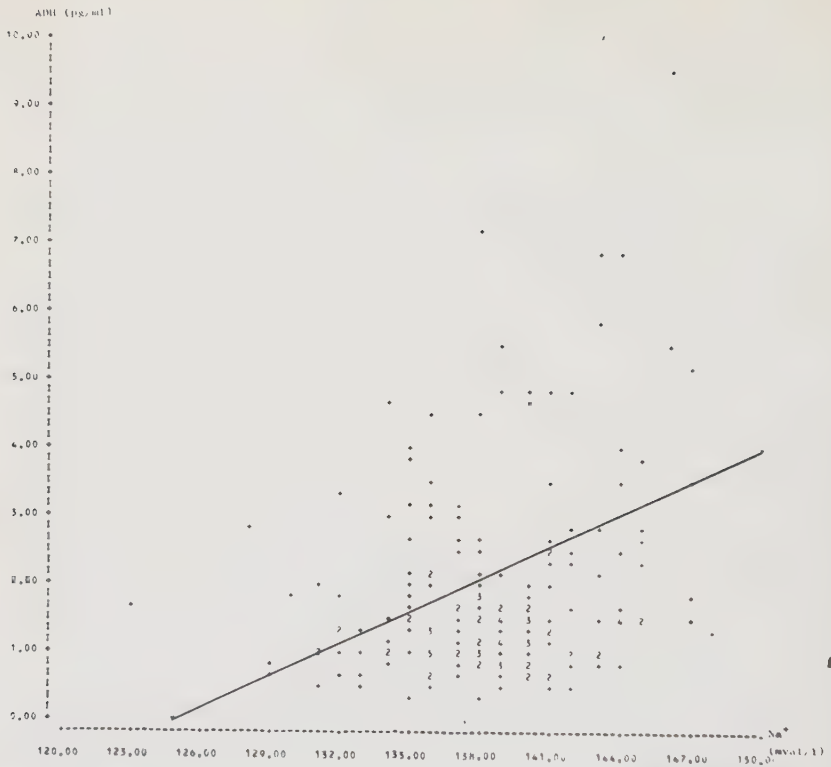


Abb. 10. Darstellung der Korrelation zwischen Natrium- und ADH-Spiegel unter Berücksichtigung aller drei Versuchsgruppen. Die Gerade gibt die Regressionsgerade von Natrium nach ADH wieder.

bereichen erfahrungsgemäß starke Abweichungen von einer linearen Abhängigkeit im Sinne eines sigmoiden Verlaufes. Dies ist auch beim ADH der Fall, wo sich z.B. auch durch übermäßige Hydrierung nicht immer eine komplette Suppression der ADH-Ausschüttung erreichen läßt.

4.3. Beziehung zwischen Natriumspiegel und Plasma-Renin-Aktivität.

Die Analyse der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) ergibt, daß bei allen drei Versuchen, inclusive der Kontrollgruppe, ein Abfall der PRA auf Werte nahe der unteren Nachweisgrenze erfolgt. Da die Basalwerte bei den drei Gruppen unterschiedlich waren, wurden die Integrale der PRA-Werte über die Zeit, also die Flächen des zeitlichen Verlaufes, berechnet und miteinander verglichen. Dabei zeigt sich der stärkste Abfall bei der ersten Versuchsgruppe, ein geringerer Abfall in der zweiten Gruppe (Mannit-Infusion) und der geringste Rückgang in der Kontrollgruppe. Folgende Erklärungsmöglichkeiten bieten sich für dieses Verhalten an:

Der PRA-Abfall in der Kontrollgruppe ist die Folge der Volumenbelastung. Zu dieser Volumenbelastung kommt in der zweiten Versuchsgruppe ein, durch die Diuresewirkung des Mannit verursachter, weiterer Faktor: Durch die osmotisch bedingte Wasserbeladung der Tubuli kommt es zu einer prozentual verminderten Natrium-Rückresorption und damit zu einem vermehrten Natriumangebot an die Macula densa-Zellen; dadurch wird die Renin-Freisetzung supprimiert.

In der ersten Versuchsgruppe mit dem stärksten PRA-Abfall addieren sich drei Faktoren, die auf die Renin-Freisetzung einwirken:

1. Die Volumenbelastung,

2. die durch die Natriumbeladung hervorgerufene erhöhte Natriumkonzentration in den Tubuli, wodurch über den gleichen Mechanismus wie bei der Gruppe mit Mannit-Infusion die Renin-Freisetzung gehemmt wird,

3. die durch die in dieser Gruppe stark erhöhten ADH-Werte verursachte Suppression der Renin-Freisetzung. Der Effekt der Natriumbelastung in dieser Gruppe manifestiert sich auch in der negativen Korrelation zwischen Serum-Natrium und PRA: Je höher die Natriumkonzentration im Serum ist, desto niedriger ist die Plasma-Renin-Aktivität.

Dem steht eine positive Korrelation zwischen beiden Parametern in der zweiten Versuchsgruppe gegenüber, welche folgendermaßen zu deuten wäre:

1. Die Natriumspiegel bewegen sich in einem wesentlich kleineren Bereich als in der ersten Gruppe,

2. im Versuchsverlauf kommt es zu einem Abfall der Serum-Natriumkonzentrationen, der durch die diuretische Wirkung des Mannit verursacht ist,

3. der Renin-Freisetzungsmechanismus spielt sich über die Natriumkonzentration in der Niere ab, wobei Serum-natrium und tubuläres Natrium-Load durch die pharmakologische Wirkung des Mannit nicht mehr parallel verlaufen.

4.4. Beziehung zwischen Osmolalität und Prolactin-Sekretion.

Bei den vorgelegten Versuchen mit Infusion hypertoner Kochsalzlösung konnte trotz einer Erhöhung der Osmolalität um maximal 5 % keine signifikante Änderung des Plasma-Prolactin-Spiegels beobachtet werden. Die Prolactin-Werte fielen im Mittel um 5 % des Ausgangswertes ab. Bei der zweiten Versuchsgruppe mit Mannit-Infusion war generell eine Tendenz mit Erniedrigung der Prolactin-Werte festzustellen. Obwohl bei dieser Versuchsgruppe der Osmolitätsanstieg nur maximal 1.5 % betrug, fiel die Prolactinkonzentration stärker als bei der ersten Gruppe, nämlich um 10 %.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen:

1. Eine Erhöhung der Osmolalität, die ein Durstgefühl auslöst und zur ADH-Ausschüttung führt, hat keinen stimulierenden Effekt auf die Ausschüttung von Prolactin.
2. Prolactin scheint beim Menschen für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes und der Flüssigkeitsbilanzierung keine entscheidende physiologische Bedeutung zu haben.

Damit werden die Beobachtungen von Adler (1) und Mitarbeitern unterstützt, die ebenfalls keinen Einfluß der Osmolalität auf die Prolactinsekretion nachweisen konnten. Die in dieser Untersuchung gefundene negative Korrelation zwischen Osmolalität und Prolactinspiegel kann für die erste Versuchsgruppe bestätigt werden. Bei der zweiten Versuchsgruppe mit Infusion von Mannit ergab sich

keine signifikante Korrelation. Da jedoch signifikante Veränderungen der Prolactinspiegel fehlen, könnte diese negative Korrelation mit einem Verdünnungseffekt erklärt werden.

Es ist bemerkenswert, daß die Prolactin-Werte bei allen drei Versuchsanordnungen während der halbstündigen Vorperiode vor Infusionsbeginn bereits abfielen. Möglicherweise kommt es durch Anlegen der Infusion zu einer streßbedingten Ausschüttung von Prolactin mit einem Anstieg der Serumkonzentration des Hormons, die allmählich wieder auf Normalwerte zurückgeht. Dies könnte auch als Erklärung dienen für die widersprüchlichen Ergebnisse von Buckman und Peake (9), die in ihren Untersuchungen möglicherweise die Streßwirkung auf die Prolactin-Sekretion zu berücksichtigen versäumten (siehe dazu auch Horrobin (23)). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei dem geringgradigen Abfall der Prolactinkonzentration in den vorliegenden Versuchen zu diskutieren. Offen bleibt allerdings, warum es bei den Kontrollversuchen mit Infusion isotoner Kochsalzlösung nicht zu einem kontinuierlichen Abfall, sondern zu einem oszillierenden Verlauf kommt.

5. Zusammenfassung.

In Anlehnung an Tierexperimente von Andersson und Olsson wurden beim Menschen Versuche mit der Frage nach einem Natrium-sensitiv gesteuerten System der ADH-Freisetzung durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden 10 freiwilligen Probanden je 500 ml 3.76 %iger Kochsalzlösung innerhalb von 2 h intravenös infundiert. Bei dem zweiten Versuch erhielten 9 von diesen 10 Probanden je eine gleiche Menge 10 %iger Mannitlösung in derselben Zeit infundiert. Als Kontrolle wurde bei 5 dieser Personen je 500 ml isotone Kochsalzlösung mit gleicher Geschwindigkeit infundiert. Nach einer 30-minütigen Vorperiode wurde während der Versuche in Abständen von 20 min. Blut entnommen und Osmolalität, Natrium, Kalium, ADH, PRA und hPRL im Plasma bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten in der ersten Gruppe einen parallelen Anstieg von Osmolalität, Natrium und ADH. In der zweiten Gruppe war nur in Einzelfällen der gleiche Verlauf nachweisbar. Die Gesamtheit der Versuchsgruppe zeigte keine Korrelation zwischen Osmolalität und ADH. Eine signifikant positive Korrelation ergab sich zwischen Natrium und ADH. Dies ist als ein Hinweis auf die Abhängigkeit der ADH-Ausschüttung von der Natriumkonzentration im Serum zu werten und spricht für die Existenz eines Natrium-sensitiven Systems auch beim Menschen.

Ein Effekt von Angiotensin auf die ADH-Freisetzung konnte durch die Renin-Suppression in beiden Versuchsgruppen, ein Volumeneffekt durch den Vergleich mit den ADH-Werten der Kontrollgruppe praktisch ausgeschlossen werden.

Die Prolactinfreisetzung wurde durch die Erhöhung der Osmolalität nicht stimuliert. Dies spricht gegen eine Beteiligung des Prolactin an der Regulation des Wasserhaushaltes beim Menschen.

6. Literaturübersicht.

1. Adler, R.A., G.Noel, L.Wartofsky, A.G.Franz: Failure of oral water loading and intravenous hypotonic saline to suppress plasma prolactin in man. J.Clin.Endocr. Metab.41, 383 (1975).
2. Ames, R.G., H.B.van Dyke: Antidiuretic hormone in the serum or plasma of rats. Endocrinology 50, 350 (1952).
3. Andersson, B.: Thirst - and brain control of water balance. Amer.Scientist 59, 408 (1971).
4. Baldes, E.J., F.H.Smirk: J.Physiol.82, 6 (1934).
5. Berl, T., P.Cadnapaphornchai, J.A.Harbottle: Mechanism of stimulation of vasopressin release during beta adrenergic stimulation with isoproterenol. J.Clin. Invest.53, 857 (1974).
6. Biro, G., M.Forsling, R.Wilmott: Mechanism of the augmented secretion of vasopressin during hemorrhage in the vagotomized dog. J.Physiol.222, 164 (1972).
7. Bond, G., J.Trank: Plasma antidiuretic hormone concentration after bilateral aortic nerve section. Amer.J. Physiol.222, 595 (1972).
8. Bonjour, J.P., R.L.Malvin: Stimulation of ADH release by the renin-angiotensin system. Amer.J.Physiol.218, 1555 (1970).
9. Buckman, M.T., G.T.Peake: Osmolar control of prolactin secretion in man. Science 181, 755 (1973).
10. Chard, T.: The radioimmunoassay of oxytocin and vasopressin. J.Endocr.58, 143 (1973).
11. Claybaugh, J., L.Share: Vasopressin, renin, and cardiovascular responses to continuous slow hemorrhage in dogs. Amer.J.Physiol.224, 519 (1973).
12. Cousineau, D., D.Gagnon, P.Sirois: Changes in plasma levels of vasopressin and renin in response to hemorrhage in dogs. Brit.J.Pharmac.47, 315 (1973).

13. Eriksson, L., O. Fernandez, K. Olsson: Differences in the antidiuretic response to intracarotid infusions of various hypertonic solutions in the conscious goat. *Acta Physiol. Scand.* 83, 554 (1971).
14. Forsling, M. L.: Bioassay and radioimmunoassay of vasopressin in relation to water metabolism. *Proc. roy. Soc. Med.* 64, 1069 (1971).
15. Gagnon, D., D. Cousineau, P. Boucher: Release of vasopressin by angiotensin II and prostaglandin E_2 from the rat neurohypophysis in vitro. *Life Sciences* 12, 487 (1973).
16. Ginsburg, M.: Production, release, transportation, and elimination of the neurohypophyseal hormones. In: *Handb. Exper. Pharm.*, Vol. XXIII, Verlag Springer (Berlin-Heidelberg-New York) (1968).
17. Gottsmann, M., T. Eversmann, E. Uhlich, K. v. Werder, G. Uhlbrecht: Stress hormone secretion during coriolis stimulation. *Kongr. Deut. Physiol. Ges., Regensburg* (Abstract, 1976).
18. Greenwood, F. C., W. M. Hunter, J. S. Glover: The preparation of ^{131}J -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114 (1963).
19. Heller, J.: The physiology of the antidiuretic hormone. IV. The effect of certain anaesthetics on the antidiuretic activity of rat blood plasma. *Physiol. Behav.* 2, 283 (1960).
20. Henry, J. P., O. H. Gauer, J. L. Reeves: Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ. Res.* 4, 85 (1956).
21. Henry, J. P., J. W. Pearce: The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *J. Physiol.* 131, 572 (1956).
22. Horrobin, D. F.: in "Prolactin 1974", Med. Techn. Publ. Co. Lancaster, Lancs. (1974).
23. Horrobin, D. F.: in "Prolactin 1976", Eden Press, Montreal, Canada (1976).
24. Humphreys, M., J. Reid: Suppression of antidiuretic hormone secretion by clonidine in the anaesthetized dog. *Kidney Internat.* 7, 405 (1975).

25. Kleeman, C.R., R.E. Cutler: The neurohypophysis. *Amer. Rev. Physiol.* 25, 385 (1963).
26. Kühn, F.: Cholinergic and adrenergic release mechanism for vasopressin in male rat. *Neuroendocrinology* 16, 255 (1974).
27. Landolt, A.M.: Treatment of acute postoperative inappropriate antidiuretic hormone secretion with diphenylhydantoin. *Acta Endocrinologica* 76, 625 (1974).
28. Leksell, L.G., F. Lishajko, M. Rungren: Negative water balance induced by intracerebroventricular infusion of Deuterium. *Acta Physiol. Scand.* (1976).
29. Malvin, R.L.: Possible role of the renin-angiotensin-system in the regulation of antidiuretic hormone secretion. *Fed. Proc.* 30, 1383 (1971).
30. Moore, W.: Antidiuretic hormone levels in normal subjects. *Fed. Proc.* 30, 1387 (1971).
31. Mouw, D., J.P. Bonjour, R.L. Malvin, A. Vander: Central action of angiotensin in stimulating ADH-release. *Amer. J. Physiol.* 220, 239 (1971).
32. Olsson, K.: Studies on the central regulation of secretion of antidiuretic hormone (ADH) in the goat. *Acta Physiol. Scand.* 77, 465 (1969).
33. Olsson, K.: Effects on water diuresis of infusion of transmitter substances into the third ventricle. *Acta Physiol. Scand.* 79, 133 (1970).
34. Olsson, K., R. Kolmodin: Inhibition of antidiuretic hormone secretion by intracarotid infusions of slightly hypertonic non-electrolyte solutions. *Acta Endocrinol.* 76, 53 (1974).
35. Perlmutt, J.H.: Reflex antidiuresis after occlusion of common carotid arteries in hydrated dogs. *Amer. J. Physiol.* 204, 197 (1963).
36. Perlmutt, J.H.: Effect of vagotomy on renal function during water diuresis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 270 (1964).
37. Peters, J.P.: Body water. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1935).

38. Relkin, R.: Effect of altered serum osmolality and pinealectomy on pituitary and plasma prolactin in the rat. *I.R.C.S.*, 1, 11 (1973).
39. Robertson, G., N. Bhoopalam, L. J. Zelkowitz: Vincristin neurotoxicity and abnormal secretion of antidiuretic hormone. *Arch. Int. Med.* 132, 717 (1973).
40. Robertson, G., S. Athar: The interaction of blood osmolality and blood volume in regulating plasma vasopressin in man. *J. Clin. Endocrinol.* 42, 613 (1976).
41. Russell, J. T., N. A. Thorn: Calcium and stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis. *Acta Endocrinol.* 76, 449 (1974).
42. Rydin, H., E. B. Verney: The inhibition of water diuresis by emotional stress and by muscular exercise. *Q. J. Exp. Physiol.* 27, 343 (1938).
43. Sachs, H., P. Fawcett, Y. Takabatake, R. Portonova: Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. *Rec. Progr. Horm. Res.* 25, 447 (1969).
44. Schrier, R., T. Berl: Nonosmolar factors affecting renal water excretion. *New Engl. J. Med.* 292, 81 (1975).
45. Shade, R., L. Share: Vasopressin release during nonhypotensive hemorrhage and angiotensin II infusion. *Amer. J. Physiol.* 228, 149 (1975).
46. Share, L.: Vasopressin, its bioassay and the physiological control of its release. *Amer. J. Med.* 42, 701 (1967).
47. Shimizu, K., L. Share, J. Claybaugh: Potentiation by angiotensin II of the vasopressin response to an increasing plasma osmolality. *Endocrinology* 93, 42 (1973).
48. Uhlich, E., R. Haslbeck, P. Weber: Prostaglandin stimulated vasopressin release from isolated rat neurohypophysis. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 193, 131 (1975).
49. Uhlich, E., P. Weber, U. Gröschel-Stewart, T. Röschlau: Radioimmunoassay of arginine-vasopressin in human plasma. *Horm. Metab. Res.* 7, 501 (1975).
50. Uhlich, E.: Vasopressin, Thieme Copythek, Thieme Verlag, Stuttgart (1976).

51. Vandeputte-van Messom, G., G. Peeters: Effect of administration of cholinergic drugs into the 3rd ventricle of goats on the water diuresis. Arch.Int.Pharm.Ther. 206, 405 (1973).
52. Verney, E.: The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. Proc.Roy.Soc. 135, 25 (1947).
53. Vilhardt, H., P. Hedqvist: A possible role of prostaglandin E_2 in the regulation of vasopressin secretion in rats. Life Sciences 2, 825 (1970).
54. Werder, K.v., C. Klemm, W. Kerner, P.C. Scriba: A hPRL-RIA using antibodies against the "little" component of serum hPRL. Endocrinology 96, 358 (Suppl.) (1975).

Herrn Prof. Buchborn danke ich dafür, daß ich den experimentellen Teil dieser Arbeit in den Einrichtungen der Medizinischen Klinik durchführen konnte, Herrn Dr. Uhlich für die Stellung des Themas und für seine Hilfe bei der Ausarbeitung.

Den Assistentinnen der nephrologischen Labors möchte ich für die vielfältige praktische Hilfe, die sie mir zukommen haben lassen, herzlich danken; in diesem Zusammenhang schließe ich Fr. Nirschl mit ein, der ich an dieser Stelle auch danken möchte.

7. Lebenslauf.

Ich, Josef Ettinger, wurde am 12. März 1953 als zweites Kind von Josef und Amalie Ettinger in Obermaischbach im Landkreis Rottal - Inn geboren.

Im September 1959 trat ich in die Volksschule in Unterdietfurt ein. Ab 1963 besuchte ich das humanistische Gymnasium in Pfarrkirchen; diese Schule schloß ich im Juli 1972 mit dem Abitur ab.

Im November 1972 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin in München. Nach vier Semestern legte ich im August 1974 die Ärztliche Vorprüfung und im August 1975 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Im März 1978 absolvierte ich den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung und im Anschluß daran das praktische Jahr im Krankenhaus.

Im April 1979 beendete ich mein Studium mit dem dritten Teil der Ärztlichen Prüfung. Ende Mai 1979 erhielt ich meine Approbation als Arzt.

München, Juli 1979

